جامعة حلب

كلية الهندسة الزراعية

قسم الإنتاج الحيواني

التنمية والإنضاج والإخصاب خارج الرحم للبويضات في نعاج العواس

رسالة أعدت لنيل درجة الدكتوراه في الهندسة الزراعية

(تخصص إنتاج حيواني)

إعداد المهندس الزراعي

عمر ماردنلي

1423هـ/2011م

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

جامعة حلب

كلية الهندسة الزراعية

قسم الإنتاج الحيواني

التنمية والإنضاج والإخصاب خارج الرحم للبويضات في نعاج العواس

رسالة أعدت لنيل درجة الدكتوراه في الهندسة الزراعية

(تخصص إنتاج حيواني)

إعداد المهندس الزراعي

عمر ماردنلي

بإشراف

الدكتور

محي المزيد

أستاذ في قسم الإنتاج الحيواني

كلية الزراعة– جامعة حلب

الدكتور

سليمان سلهب

أستاذ في قسم الإنتاج الحيواني

كلية الزراعة– جامعة دمشق

1423هـ/2011م

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

بسم الله الرحمن الرحيم

﴿ وَيَسْأَلُونَكَ عَنِ الرُّوحِ قُلِ الرُّوحُ مِنْ أَمْرِ رَبِّي وَمَا أُوتِيتُمْ مِنَ

الْعِلْمِ إِلا قَلِيلاً ﴾

صدق الله العظيم

سورة الإسراء

الآية (85)

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

تصريح

أصرح بأن هذا البحث **(التنمية والإنضاج والإخصاب خارج الرحم للبويضات في نعاج العواس)** لم يسبق أن قدم للحصول على أية شهادة، ولا هو مقدم حالياً للحصول على أية شهادة أخرى.

المرشح: **عمر ماردنلي**

Declaration

This is hereby declared that this work "**The In Vitro Development, Maturation and Fertilization of Oocytes in Awassi Ewes** " has not been accepted for any degree or it is not submitted to any other degree.

Candidate

Omar Mardenli

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

شهادة

نشهد بأن العمل الموصوف في هذه الرسالة (**التنمية والإنضاج والإخصاب خارج الرحم للبويضات في نعاج العواس**) هو نتيجة بحث علمي قام به المرشح الطالب عمر ماردنلي تحت إشراف كل من الدكتور محي المزيد (**المشرف العلمي**) أستاذ في قسم الإنتاج الحيواني، كلية الزراعة–جامعة حلب و الدكتور سليمان سلهب (**المشرف المشارك**) أستاذ في قسم الإنتاج الحيواني بكلية الزراعة– جامعة دمشق، وان أية مراجع أخرى ذكرت في هذا العمل موثقة في نص هذه الرسالة وحسب ورودها في النص.

المشرفان

المرشح	**الأستاذ الدكتور**	**الأستاذ الدكتور**
عمر ماردنلي	**محي المزيد**	**سليمان سلهب**

Certificate

It is hereby certified that the work described in this thesis "**The In Vitro Development, Maturation and Fertilization of Oocytes in Awassi Ewes** " is the result of the authors own investigation under supervision of Dr. Mohi Al-Mizied (main supervisor) Prof at the Department of Animal Production in the Faculty of Agriculture, Aleppo University and Dr. Solieman Salhab (assistant supervisor) Prof. at the Department of Animal Production in the Faculty of Agriculture, Damascus University. In addition, any other references mentioned in this work are documented in the text of other treatise .

Supervisors

candidate	**Prof. Dr.**	**Prof. Dr.**
Omar Mardenli	**Solieman Salhab**	**Mohi Al-Mizied**

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

قدمت هذه الرسالة استكمالاً لمتطلبات الحصول على درجة الدكتوراه في الهندسة الزراعية (الإنتاج الحيواني) في جامعة حلب.

This Thesis has been submitted in accordance with the requirements for the degree of Doctorate in Animal production, at the faculty of Agriculture ,Aleppo University.

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على اشرف المرسلين سيدنا محمد صلى الله عليه وآله وصحبه وسلم و بعد..

أقدم شكري وتقديري إلى أستاذي الفاضل سعادة **الأستاذ الدكتور محي المزيد** المشرف على الرسالة على ما بذله من جهود مخلصة ومساعدة قيمة وتوجيهات سديدة وحكيمة كان لها الأثر الكبير في تطور وإتمام هذا البحث، فله مني وافر التقدير والامتنان والدعاء له بالصحة والعافية وان يجزيه الله عني وعن طلبة العلم موفور الجزاء.

كما أتوجه بجزيل الشكر والتقدير إلى أستاذي الفاضل سعادة **الأستاذ الدكتور سليمان سلهب** على تفضله بالمشاركة بالإشراف على الرسالة وتصويبها في مراحلها الأولية والنهائية وإثرائها بآرائه وتوجيهاته فله مني جزيل الشكر وفائق التقدير والاحترام.

كما أتوجه بخالص الشكر والتقدير إلى أعضاء الهيئة التدريسية بقسم الإنتاج الحيواني من أكاديميين وإداريين وفنيين على ما بذلوه من مساعدة خلال المشوار العلمي.

واسأل الله أن يجزي الجميع خير الجزاء، وآخر دعوانا أن الحمد لله رب العالمين.

عمر ماردنلي

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

قائمة المختصرات الإنكليزية

الاختصار	المصطلح العلمي
Ana	Anaphase
AR	Acrosome Reaction
BMP-15	Morphogenetic Protein-15
BSA	Bovine Serum Albumin
c-AMP	Cyclic – Adenosine Monophosphate
CEEF	Cumulus Expansion Enabling Factor
Cg	Cortical Granules
COCs	Cumulus oophorus complexes
CR	Corona Radiata
DM	Define Media
DMSO	Dimethyl SulphOxide
EG	Ethylene Glycol
EGF	Epidermal Growth Factor
ESS	Estrus Sheep Serum

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

FCS	Fetal Calf Serum
FF	Follicular Fluid
FSH	Follicle Stimulating Hormone
G.V	Germinal Vesicle
GAGs	Glycosamino Glycans
GDF-9	Growth Differentiation Factor-9
GH	Growth Hormone
gj	Gap Junction
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormones
GSH	Glutathione
GVBD	Germinal Vesicle Breakdown
hCG	Human Chorionic Gonadotropin
IGF-I	Insolin Like Growth Factor
IVC	In Vitro Cuiture
IVF	In Vitro Fertilization
IVM	In Vitro Maturation
IVP	In Vitro Production

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

LH	Luteinizing Hormone
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MEME	Menimum Essential Medium
M-I	Metaphase – I
M-II	Metaphase – II
MOET	Multiple Ovulation And Embryo Transfer
MPF	Maturation Promoting Factor
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
OMI	Oocyte Maturation Inhibitory
oOEC	Ovine Oviduct Epithelial Cells
OSF	Oocyte Secreted Factors
PB	Polar Body
PES	Phenazine Ethosulphate
PBS	Phosphate buffer saline
PVA	Polyvinylalcohol
RNA	Ribonucleic Acid
ROS	Reactive Oxygen Specie

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

SOF	Sythensis Oviduct Fluid
TALP	Tyrode Albumin Lactate Pyrovate
TCM-199	Tissue Culture Media-199
Tel	Telophase
TGF	Transforming Growth Factor
TGF-α,TGF-β	Transforming Growth Factor α&,β
ZP	Zona Pellucida

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

الفهرس

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

فهرس الجداول

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

فهرس الاشكال

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

فهرس الملاحق

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

فهرس الصور

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

الملخص العربي

أجريت الدراسة في مخبر التقانات الحيوية للدراسات العليا بقسم الإنتاج الحيواني في كلية الزراعة – جامعة حلب خلال الفترة الممتدة من 2008/3/15 ولغاية 2010/10/30 بهدف إنضاج بويضات نعاج العواس، وإخصابها، وانقسامها مخبرياً، ودراسة تأثير كل من عمر النعاج، وفصل السنة، وتفاعلهما، وقطر الحويصلة المبيضية، وقطر البويضة، ومستوى هرمون الـ FSH، وتركيز السيستامين في معدلات الإنضاج، والإخصاب، وانقسام البويضات المخصبة مخبرياً باتجاه وصولها لمرحلة الجسم الأصلي، وتحديد أفضل موانع التجمد في حماية الأجنة المنتجة مخبرياً خلال عملية التجميد بالتزجيج.

جمعت المبايض دورياً كل أسبوع على مدار العام وطوال فترة الدراسة من نعاج عواس أعمارها 8 أشهر– 4 سنوات وذلك بعد 10–15 دقيقة من الذبح في أوعية بلاستيكية تحوي محلول فيزيولوجي و مضادات حيوية بدرجة حرارة 30–37ْم ونقلت إلى المخبر خلال مدة لا تتجاوز ساعة واحدة. شُرطت أسطح المبيض، ثم غسلت بمحلول الـ PBS الدافئ، واستقبلت البويضات الناتجة في طبق بتري يحتوي المحلول السابق مع مضادات حيوية.

خصصت في التجربة الأولى 1363 بويضة ووزعت حسب أعمار النعاج إلى ثلاث فئات: المجموعة A (<1 سنة)، و المجموعة B(1–2 سنة)، والمجموعة C (> 2 سنة)، **كما خصصت في التجربة الثانية**، بويضات أخرى (1363 بويضة) وقسمت إلى أربع مجموعات حسب تاريخ جمع المبايض بما يتناسب وفصول السنة الأربعة. ووزعت **في التجربة الثالثة** البويضات حسب قطر الحويصلات المبيضية التي جمعت منها إلى أربع مجموعات: تضمنت المجموعة A الحويصلات التي قطرها <1 مم، والمجموعة B على الحويصلات التي أقطارها بين 1 واقل من 2 مم، والمجموعة C على الحويصلات التي أقطارها بين 2 واقل من 3 مم، والمجموعة D الحويصلات التي أقطارها ≤3 مم، كما قسمت البويضات، **في التجربة الرابعة** حسب أقطارها إلى أربع مجموعات: تضمنت المجموعة A البويضات التي أقطارها <100 مايكرومتر، و المجموعة B البويضات التي أقطارها تراوحت بين 100 واقل من 110 مايكرومتر، و المجموعة C البويضات التي أقطارها تراوحت بين 110 واقل من 120 مايكرومتر، في حين اقتصرت المجموعة D على البويضات التي أقطارها ≤ 120 مايكرومتر.

وفي التجربة الخامسة، أضيفت خمسة تراكيز من هرمون FSH للوسط الزرعيTCM-199 لإنضاج 1332بويضة: تضمنت المجموعة A (شاهد)، والمجموعة B (0.1 مايكروغرام FSH/مل)، والمجموعة C (1 مايكروغرامFSH /مل)، والمجموعة D (5 مايكروغرام FSH /مل)، والمجموعة E (50 مايكروغرام FSH /مل)، والمجموعة F (75 مايكروغرامFSH /مل).

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

وأضيف **في التجربة السادسة** إلى الوسط الزرعي TCM-199 ثلاثة تراكيز من السيستامين لإنضاج 942 بويضة وفق مايلي: المجموعة A (شاهد)، والمجموعة B (100 مايكرومولر)، والمجموعة C (200 مايكرومولر)، والمجموعة D (400 مايكرومولر). **وفي التجربة السابعة،** جمعت 212 بويضة، وقسمت الى ثمان مجموعات لمتابعة مراحل الإنضاج النووي وفقاً لفترات الإنضاج بعد مرور 0، و3، و6، و9، و12، و21، و24، و27 ساعة من الحضن المخبري باستعمال الوسط الزرعي TCM- 199 .

وضعت 10−15 بويضة في كل حجرة، ثم غطيت بزيت البارافين، ونقلت إلى حاضنة للإنضاج ضمن الشروط CO_2 بتركيز 5%، ودرجة حرارة 38.5 ْم، ورطوبة نسبية عالية 95% لمدة أقصاها 27 ساعة. غسلت وأزيلت طبقة الخلايا الركامية المحيطة بالبويضات باستعمال ماصة دقيقة . اعتمد الوسط TALP لإكساب نطاف كباش العواس(1.5×10^6 نطفة / مل) ظاهرة الاستعداد و استكمال نضجها النهائي، وضعت 5−10 من البويضات العارية الناضجة لكل 1 مل من وسط الإخصاب الحاوي على النطاف في طبق بتري، ثم نقلت إلى حاضنة CO_2 بتركيز 5% وبدرجة حرارة 38.5 ْم وتركت لمدة 17 −18 ساعة، بعدها غسلت البويضات في محلول الـ PBS للتخلص من بقايا النطاف المتعلقة بالبويضة، وفحصت تحت المجهر المعكوس لملاحظة إخصاب البويضات (الجسم القطبي الثاني والبداءتان النوويتان) ثم زرعت البويضات المخصبة في الوسط الخاص للانقسامات وأعيدت إلى الحاضنة لمتابعة تطورها وتقسمها من مرحلة 2 خلية حتى الكيس الأصلي وتفقدها كل 24 ساعة .

وفي التجربة الثامنة، عزلت 105 بويضات مخصبة وصلت إلى مراحل مختلفة من التطور الجنيني، وضعت في أوساط احتوى أولاها على DMSO كمانع تجميد، واحتوى الثاني على EG، كمانع تجميد آخر في حين احتوى الوسط الثالث على مزيج من DMSO وEG . نقلت الأجنة من أوساطها ووضع 6 أجنة في القشة الواحدة (0.25) مم وأغلقت جيداً بجهاز خاص، ووضعت في السائل الآزوتي بعد أن تركت 8 دقيقة في محلول الموازنة و دقيقة واحدة في محلول التجميد قبل تغطيسها ، وحفظت في خزان السائل. تركت الأجنة في الآزوت السائل لمدة ثلاثة أيام (72 ساعة) ثم أذيبت بوضعها في وسطين A (1 M سكروز و20% مصل بقري، و-TCM 199) لمدة دقيقة ودرجة حرارة 37 مئوية وB (0.5 M سكروز و20% مصل بقري، و-TCM 199) لمدة 3 دقائق بدرجة حرارة25 مئوية. ثم وضعت في الوسط الزرعي الخاص بالانقسامات وغطيت بزيت البارافين وأعيدت إلى الحاضنة من اجل تحديد الأجنة الباقية.

حللت البيانات بطريقة مربع كاي وفق contingency tables ودرست المقارنات الزوجية للنسب الناتجة بطريقة فيشر الدقيقة عند مستويي معنوية $p < 0.01$ و $p < 0.05$ باستخدام البرنامج الإحصائي SAS,9.

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

أشارت نتائج الدراسة إلى وجود تأثير معنوي($p < 0.01$) لعمر النعاج في نسبة البويضات الناضجة، وغير معنوي في معدلات إخصابها وانقسامها مخبرياً، و كانت أعلى نسبة إنضاج (62.67%) في البويضات التي مصدرها نعاج المجموعة B (1– <2 سنة). كما وجد تأثير معنوي ($p < 0.01$) لموعد جمع البويضات حسب فصل السنة في معدل إنضاج بويضات الأغنام (أعلاها خلال فصلي الخريف،56.87% والصيف، 57.98%)، وفي معدل الإخصاب الخارجي (أعلاها في البويضات التي جمعت خلال فصل الصيف،37.91%)، في حين لم يكن الفرق معنوياً في نسب انقسام البويضات مخبرياً حسب فصول السنة. و كان للتداخل بين فصل السنة وعمر النعاج المانحة تأثير معنوي ($p < 0.01$) في معدلات الإنضاج المخبري للبويضات (أعلاها في فصل الخريف عند المجموعة B)، و في معدلات إخصاب البويضات(أعلاها في فصل الصيف عند المجموعة B)، بينما لم يلحظ فرق معنوي في معدلات الانقسام بين المجموعات العمرية حسب فصول السنة.

وأظهرت النتائج أن لقطر الحويصلات المبيضية تأثير معنوي ($p < 0.01$) في معدلات إنضاج البويضات وإخصابها مخبرياً، فكانت أعلاها(70.83% و61.76%) في بويضات حويصلاتها التي تساوت أو زادت أقطارها عن 3 مم (المجموعة D)، بينما لم يكن الفرق معنوياً في نسب الانقسام المخبري للبويضات ، مع ملاحظة فشل البويضات المنضجة في المجموعات التي كان قطر الحويصلات فيها اقل من 2 مم (المجموعتين A وB) من متابعة الإخصاب و الانقسام مخبرياً.

وتبين أن معدلات إنضاج البويضات في المخبر تختلف أيضا باختلاف قطر البويضات، فبلغت أعلاها 72.30 –82.02%($p < 0.01$) في البويضات التي أقطارها تساوي أو أكبر من 110 مايكرومتر(المجموعتين C وD)، وفشلت البويضات التي أقطارها اقل من 110 مايكرومتر في الوصول إلى مرحلة الانقسام المخبري، في حين استطاعت البويضات الأكبر حجما من الوصول إلى مرحلتي الإخصاب والانقسام، لكن دون وجود فرق معنوي في معدلات الإخصاب والانقسام بين بويضات أقطارها 100–120 مايكرومتر، و$\leq$ 120 مايكرومتر.

كما تبين أن إضافة هرمون الـ FSH إلى وسط الإنضاج كان له تأثير اختلف في درجة معنويته في إنتاج الأجنة مخبرياً. فساعدت إضافته($p < 0.01$) بتركيز لا يقل عن 50 مايكروغرام في الحصول على أفضل معدلات إنضاج (المجموعتينE 83.56% و F، 83.66 %)، في حين كان للتراكيز العالية دور ($p < 0.01$) في تقليص نسب الأجنة التي توقفت في مرحلة 2–16 خلية، وبلغت أدناها في المجموعتين E و F، ولوحظ فرق معنوي آخر ($p < 0.05$) في نسب البويضات التي وصلت إلى مرحلة التويتة وبلغت أعلاها في المجموعتين E و F، ذات التراكيز العالية، وجاءت نسب البويضات التي وصلت إلى مرحلة الكيس الأصلي غير

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

معنوية رغم استمرار تفوق المجموعتين E و F. وبينت النتائج أن إضافة السيستامين بتركيز 100 مايكرومولر (المجموعةB) ساعد في الحصول على أفضل ($p < 0.05$) معدلات إنضاج(80.57%) للبويضات بينما لم يكن لإضافته تأثير معنوي في معدلات إخصاب وانقسام البويضات، ولكن أظهرت إضافته بالتركيز السابق استمرار دوره الفعال في إنتاج عدد من الأجنة في مرحلتي التويتة(39.29%) والكيس الأصلي(42.86%) بصورة أكبر ($p < 0.05$) من التراكيز في المجموعات الأخرى.

كما أشارت نتائج دراسة مراحل تطور النوى جراء فحص البويضات التي اختيرت للإنضاج المخبري خلال فترات زمنية مختلفة ان نسبة البويضات في مرحلة الـ GV بلغت 88.46% قبل بدء الإنضاج، وأصبحت 9.67% بعد مرور 12 ساعة من الإنضاج، وأن 53.84% من البويضات وصلت لمرحلة الـ GVBD بعد 6 ساعات من بدء الإنضاج، و أن 16.66% وصلت لمرحلة M-I بعد 9 ساعات من الإنضاج، و71.42% منها وصلت مرحلة الـ M-II بعد 27 ساعة. كما تبين أن استخدام مزيج من موانع التجمد (DMSO+EG) بنسبة 1:1 ساعد في الحصول على أفضل معدلات بقاء ($p < 0.01$) للأجنة في مراحل2−16 خلية(50%)، و الجسم التوتي (90%)، والكيس الأصلي (92.85%)، عند تجميدها بطريقة التزجيج.

واستنتج أن جميع المبايض المجموعة من نعاج العواس في المسلخ خلال فصلي الخريف والصيف والحصول على بويضات أقطارها ≤ 120 مايكرومتر من حويصلات أقطارها ≤3مم وإضافة الـ FSH (<50 مايكروغرام /مل) أو السيستامين (100 مايكرومولر) لوسط الزرع TCM-199 يكون مفيداً جداً في برامج إنتاج الأجنة مخبرياً، كما أن استخدام مزيج متساوي من مانعي التجميد DMSO وEG ساعد في الحصول على معدلات بقاء للأجنة المنتجة مخبرياً بصورة اكبر عند تجميدها بالتزجيج.

كلمات مفتاحية: نعاج العواس، عمر النعاج، فصل السنة، قطر الحويصلة، قطر البويضة، FSH، السيستامين، الإنضاج مخبري، الإخصاب المخبري، الانقسام المخبري، أجنة، تويتة ، كيس اصلي ، الإنضاج النووي، التزجيج، DMSO، EG ،معدل بقاء الأجنة.

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

الفصل الأول

المقدمة والدراسة المرجعية

Introduction
and
Literature review

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

المقدمة Introduction

تتميز أغنام العواس إضافة إلى صفاتها الإنتاجية الجيدة بتأقلمها مع بيئات المراعي الفقيرة في المناطق الجافة وشبه الجافة التي لا تصلح للزراعة بشكل عام. وتشير الدراسات إلى أن أفراد هذه السلالة تمتلك طاقات إنتاجية كامنة ومتعددة كما تتميز بمقاومة عالية للأمراض المحلية، وتَحَمُّل كبير للظروف البيئية والغذائية والمناخية، كما أنها تستجيب للتحسين الوراثي(**طليمات**، 1996).

تُعد سلالة أغنام العواس العرق الوحيد المنتشر في سورية، و تشكل لحومها المصدر الرئيس للحوم الحمراء المخصصة للاستهلاك المحلي في القطر وتصل مساهمتها إلى نحو 75% من إجمالي اللحوم الحمراء المستهلكة، ونتيجة لذلك فإن عملية تسمين هذه الأغنام وتصديرها تساهم بنحو 16% من إجمالي الصادرات الزراعية في القطر. وتشير الإحصائيات إلى ازدياد أعداد الأغنام في القطر العربي السوري بدءاً من العام 1999 (14مليون رأس) حتى وصلت عام2007 إلى 23 مليون رأس (**المجموعة الإحصائية، 2008**).

إن استخدام التقانات الحديثة في مجال تربية الحيوان ساعد كثيراً في رفع الكفاءة التناسلية والقدرة الإنتاجية لدى كثير من الحيوانات الزراعية وخاصة الأغنام التي أصبحت تربيتها وزيادة أعدادها أمراً ملحاً (**المزيد، 1991**)، إذ يعد استخدام التلقيح اصطناعي(A.I) Artificial Insemination الأداة الأولى والرئيسة التي ساعدت على نشر العوامل الوراثية لذكور مختبرة وعالية الإنتاج، كما أصبح من الممكن وباستخدام تقانة نقل الأجنة Embryo Transfer (E.T)وزرعها الاستفادة من الطاقة الوراثية للنعاج العالية الإنتاج وزيادة عدد المواليد المنتجة منها سنوياً. ومن التقانات الحديثة أيضاً ما يسمى بتوقيت الاباضة Ovulatory Synchronization، وتشخيص الحمل Pregnancy Diagnosis وتحريض الولادة Stimulation of Parturition التي فيما لو استخدمت ستدفع بعجلة تطور الإنتاج الحيواني لدرجة يمكن فيها تقصير فترة الجيل وتنظيم عمليات الرعاية التناسلية (**زكريا و سلهب، 1991**).

يعد الإنضاج المخبري (خارج الرحم) In Vitro Maturation(IVM) والإخصاب المخبري In Vitro Fertilization (IVF) إجراءان مهمان في برامج إنتاج الأجنة مخبرياً In Vitro Embryo Production (IVEP) و التي أصبحت القاعدة الواسعة والعريضة لأبحاث أخرى لا تقل عنهما أهمية مثل تجميد البويضات (**Kim وزملاؤه، 2001**)، والأجنة (**Vajta**

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

وزمـــلاؤه، 2001)، نقـل النـواة nuclear transport، وإنتـاج الحيوانـات المحـورة وراثيـا Transgenic Animals(**Baldassare وزملاؤه، 2002 ؛ Cognie وزملاؤه، 2003)**.

تعد بويضات المجترات الصغيرة (الأغنام والماعز) التي يتم جمعها من المذابح مصدرا اساسياً ورخيصاً لإنتاج الأجنة مخبرياً ويساعد هذا الإجراء في تسريع تحسين الحيوانات وراثياً وبالتالي رفع كفاءتها الإنتاجية والتناسلية **(Samake وزملاؤه، 2000)**.

ويعد تحسين القدرة التناسلية عند المجترات، ومن ضمنها الأغنام حجر الأساس في حل العديد من العقبات والعراقيل التي يعاني منها الإنتاج الحيواني بعناصره المختلفة وفي تحقيق مردودية أفضل مـن الحيوانـات الزراعيـة خاصـةً التـي تتسم بموسـمية تناسـلها. إن اسـتخدام التقانـات الحديثـة كالإخصاب الخارجي يعتبر من الوسائل الهامة لزيادة الاستفادة من الإناث ذات الصفات الوراثية الجيـدة ونشـرها علـى نطـاق واسـع، وإن هـذه التقانـات لا تقـل أهميـة عـن طـرق التحسـين الـوراثي التقليدية وقد تتفوق عليها.

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

الدراسة المرجعية Literature Review

أولاً– تنمية البويضات وإنضاجها مخبرياً In Vitro Maturation (IVM)

يعد إنضاج البويضات أهم مرحلة في برامج إنتاج الأجنة مخبرياً، إذ أنها تتطلب توفر ظروف خاصة ومحددة من الحرارة، والرطوبة، والغازات. تعد درجة حرارة 39 مئوية، وغاز CO_2 (5%)، ومدة إنضاج قدرها 24–27 ساعة كفيلة بإيصال 90% من البويضات المحضنة إلى مرحلة الـ M-II (Metaphase-II). يعتمد إنضاج البويضات على مسارين يتعلق أولاهما **بالإنضاج السيتوبلاسمي** Cytoplasmic Maturation، أما المسار الثاني فيختص بإنضاج النواة وهو **الإنضاج النووي** Nuclear Maturation (**Mermillod وزملاؤه، 2006**).

تحدث في البويضات أثناء **الإنضاج السيتوبلاسمي** تغيرات شكلية وترتيب محدد في مكونات سيتوبلاسم البويضة تمهيداً لتكوين البداءات النووية الذكرية والأنثوية (طلائع الانوية)، وفيها تهاجر الحبيبات القشرية (Cortical granules) باتجاه غشاء البويضة (Ooplasm) إذ تُخَزَّن هذه الحبيبات خلال مراحل نمو البويضات لتطلق مكمونها الإنزيمي في الحيز المحيط بالمح (Perivetilline space)، بعد اختراق النطفة للنطاق الشفاف لتقوم تلك الإنزيمات بإحداث تغيير في نفاذية النطاق الشفاف مما يحول دون اختراق نطاف أخرى ودخولها إلى البويضة (**Cran، 1989**).

أوضح **Mermillod وزملاؤه (2006)** أن الدليل الوحيد المرئي على اكتمال النضج السيتوبلاسمي للبويضات هو تمدد الخلايا الركامية (Cumulus expansion) التي تقوم بإنتاج حامض الهيالورون (hyaluronic acid) الذي يلعب دوراً هاماً في زيادة الفراغ الخلوي بين الخلايا الحبيبية خلال عملية الإنضاج، لذلك فإن المحافظة على تلك الطبقة من الخلايا يعد عاملاً محدداً من عوامل نجاح الإنضاج المخبري، تلعب العوامل التي تفرزها البويضة OSF (Oocyte Secreted Factors) دوراً في تمايز الخلايا الركامية خلال أطوار نمو الحويصلات المبيضية (**Li وزملاؤه ،2000**)، أوضح **Dragovic وزملاؤه (2005)** أن العوامل السابقة تتيح للخلايا الركامية إمكانية التمدد خلال الإنضاج المخبري.

لا تستطيع البويضة خلال الإنضاج السيتوبلاسمي مخبرياً تصنيع جميع البروتينات التي تحتاجها خلال طور النمو (**Schultz، 1986**) بل إن جزءاً منها يتم الحصول عليه من بروتينات

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

المصل البقري (**Glass، 1971**). ويعتبر هرمون FSH المسؤول عن إبقاء مستوى cAMP (Cyclic Adenosine Monophosphate) مرتفعاً داخل البويضة سبباً ببقائها في طور السكون، وعند انخفاض مستوى الـ FSH فإن مستوى الـ cAMP ينخفض داخل البويضة مما يسمح بالتعاقب التطوري للبويضة لبلوغ مرحلة M-II (**Downs وزملاؤه، 1989**). وعند بدء نضج البويضة استجابة لارتفاع مستويات الهرمونات المحفزة للقند قبل الاباضة بقليل، فان الخلايا الركامية تنتج حامض الهيالورون الذي يربط الخلايا الركامية برابط بروتيني (**Eppig، 1979**)، وعند امتزاج الحامض مع السوائل (Hydrates) فان الفراغ بين الخلايا الركامية يبدأ بالتوسع (تمدد الخلايا الركامية)، وفي حالة منع تمدد هذه الخلايا فان نسبة الاباضة تنخفض كثيراً (**Chen وزملاؤه، 1993**)، كذلك عند غياب هرمون الـ FSH يتم تثبيط عملية تصنيع حامض الهيالورون من قبل الخلايا الركامية. أشار **Eppig** (**2001**) أيضاً أن البويضة التامة النمو تنتج العامل Cumulus Expansion Enabling Factor (CEEF) الذي يتيح للخلايا الركامية الاستجابة إلى تأثير هرمون الـ FSH وإنتاج حامض الهيالورون.

تعد الخلايا الحبيبية بما فيها الخلايا الركامية (Cumulus Oophorus) المحيطة بالبويضة عاملاً مساعداً على إنضاجها مخبرياً في الأبقار (**Fukui وSakuma، 1980**)، والنعاج (**Crosby وزملاؤه، 1981**)، والماعز (**Martino وزملاؤه، a 1994**)، كذلك تلعب الخلايا الحبيبية دوراً في نقل المواد الغذائية بين البويضة والبيئة الخارجية (**Tatemoto و Horiuchi، 1995**)، كما تعد ضرورية لنقل الطاقة اللازمة للبويضة (**Sato وزملاؤه، 1977**). أظهرت نتائج **Defelici وSiracusa** (**1982**) بأن للخلايا الحبيبية المحيطة ببويضات الفئران دوراً في تقليل تصلب النطاق الشفاف خلال الإنضاج و غيابها يزيد من تصلب النطاق الشفاف وبالتالي إعاقة اختراق النطاف و انخفاض نسبة الإخصاب.

أوضح **Hussein وزملاؤه** (**2005**) الدور الهام لعوامل النمو وتأثيرها في النواحي الوظيفية والحيوية للخلايا الركامية وإنضاج البويضات، حيث يتم إفراز تلك العوامل من البويضة مثل GDF-9 (Growth Differentiation Factor-9) وBMP-15 (Morphogenetic Protein-15) اللذان ينتميان إلى عائلة TGF (Transforming Growth Factor)المعروفة بتأثيرها الايجابي في القدرة التطورية للبويضات وفي حمايتها من الاضمحلال والتدهور لذلك لابد من إضافة تلك العوامل إلى أوساط الإنضاج من اجل المحافظة على الحالة الوظيفية للخلايا الركامية.

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

يمثل **الإنضــاج النــووي** قدرة و قابليـة البويضـة الأوليـة للوصـول إلـى نهايـة الانقسـام الاختزالي الأول (Meiotic Competence) والذي يعرف بقدرة البويضـات بلوغ مرحلة تهدم الغلاف النووي Germinal vesicle breakdown (GVBD) ، وتعاقب طور الـ M-I (Metaphase–I) مـع بـروز الجسـم القطبـي الأول والوصـول إلـى طـور M-II (**Vigneron وزملاؤه، 2004 a ؛ 2004b**).

بـين **Mermillod** و **Marchal** (**1999**) أن البويضـات الأوليـة (primary) تكـون فـي المبيض على شكل مجموعات متوقفة (blocked)عند الطور Prophase-I من الانقسام المنصف الأول، وفي تلك المرحلة يدعى الشكل المدور للنواة بالحويصل الجرثومي أو الغلاف النووي GV (Germinal Vesicle) حيث تكـون النـواة محتويـة علـى كرومـاتين مبعثـر. وخـلال المراحل المبكرة لتشكيل الحويصلة المبيضية، فإن البويضات تنمو مجتازة تغيرات شكلية معقدة تخزن خلالها الجزيئـات (بروتينـات وRNAs) التـي تكـون عـاملاً محـدداً للإخصـاب النـاجح والتطـور الجنينـي المبكر فيما بعد. وتكتسب البويضات القدرة علـى الانقسام الاختزالي خلال المراحل الأولـى من تشـكل الحويصـلة المبيضـية وذلـك بعـد بدايـة ظهـور الفجـوة الحويصـلية (antral cavity) (**Mermillod وزمـلاؤه، 2006**)، ويلي ذلك حاجة البويضات إلى مرحلة ضرورية من التمايز خــلال المراحــل المتــأخرة مــن النمــو الحويصــلي للوصــول إلــى القــدرة الكاملــة للإنضــاج السيتوبلاسـمي(**Sirard، 2001**). وأشـار **Sirard وزمـلاؤه** (**2006**) إلـى أن نحـو 90% مـن البويضات المجموعة من حويصلات مبيضية أقطارها 3مم في الأبقار تكون قادرة على استكمال الإنضاج النووي ومع ذلك فإن نسبة قليلة منها تكون مؤهلة للإنضاج السيتوبلاسمي، وبناء على ذلك فإن 30 إلى 40% من البويضات تصل إلى مرحلة الكيس الأصلي في الإخصاب المخبري. وأوضـح **Tsafriri وزمـلاؤه** (**1982**) أن الانقسـام الاختزالـي لبويضـات الثـديات عمليـة متتابعـة يتخللهــا العديــد مــن مراحــل التوقــف والاســتمرار، وخــلال عمليــة تكــوين الحويصــلات Folliculogeneses تكون بويضـات الثـديات فـي طـور السكون (dictate stage) من الطـور الاختزالـي الأول Prophase -I ، ويسـتأنف الانقسـام الاختزالـي عنـد البلـوغ اسـتجابة للارتفـاع المفاجئ لهرمونات المناسل قبل الاباضة FSH-LH Surge (**Ayalon وزمـلاؤه، 1972**)، و يتضـمن اسـتئناف الانقسـام الاختزالـي قبـل الاباضـة زوال وتلاشـي الغـلاف النـووي (GVBD)، و بلـوغ طـور الــ M-I، وبـروز الجسـم القطبـي الأول، والوصـول إلـى طـور الــ M-II (**Masui وClarke، 1979**). فالقدرة التطورية لبويضـات الثديات تُكتسب من قبل البويضـة خلال مراحل تكوين البويضات Oogenesis (**Motlik وFulka، 1986**)، لذلك تلاحظ بعض الاختلافات

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

بين الأنواع، إذ تصل البويضات إلى الحجم التام عند شروع تكوين التجويف الحويصلي في الفئران (**Chouinard، 1971**)، الجرذان (**Bar-Ami وTsafriri ، 1981**) والهامستر (**Iwamatsu وYanagimachi، 1975**)، بينما تصل بويضات الأبقار، والأغنام، والخنازير إلى الحجم التام لها في مراحل متأخرة من تطور الحويصلة المبيضية (**Motlik وFulka، 1986**).

أوضح **Sirard** (**2001**) أن البويضات المجموعة من حويصلات مبيضية نامية تكون متوقفة عند الطور الأول Prophase - I من الانقسام الاختزالي الأول وبمجرد تحررها من بيئة الحويصلة المبيضية التي تمنعها من استكمال الانقسام الاختزالي فإن أنويتها تستمر في استكمال الانقسام، إن هذا التوالي التلقائي للانقسام الاختزالي للبويضات خارج حويصلاتها المبيضية يعتبر القاعدة والأساس لمبدأ الإنضاج المخبري. تشهد البويضات النامية بعد ساعات قليلة من الإنضاج المخبري عملية اكتمال زوال وتلاشي الغلاف النووي GVBD (**Donahue، 1968**) وهذه العملية تبدأ بتموّج قليل للغلاف النووي ، وتستمر مع زيادة نفاذية الغلاف النووي وهذا التموج ربما يرتبط مع تكاثف الصبغيات الذي يحصل خلال تلك الفترة.

أوضح **Wassarman** (**1996**) أن تكاثف الصبغيات يحصل خلال 20 دقيقة من تحلل النواة، وبعد 2–3 ساعات تكتمل عملية تكاثف الصبغيات لتصبح مرتبة بشكل دائري في مركز البويضة، و بعد 6 ساعات من الانضاج المخبري تقريباً يمكن تمييز المغزل بسهولة، ويصبح واضحا بعد 9 ساعات لبويضات الفئران. وبعد 13 – 15 ساعة من الانضاج المخبري لبويضات الفئران يلاحظ سيادة طوري الـ Anaphase (Ana) و Telophase (Tel) وخلال تلك الفترة يتكون الجسم القطبي الأول First Polar Body (PB) الذي يحوي على نصف الصبغيات عند نهاية طور الـ Tel ، و يحتوي على مكونات مختلفة مثل الميتوكوندريا، الريبوزومات والحبيبات القشرية. يكون الغلاف البلازمي للجسم القطبي عادة أملس نسبياً (Smooth)، ثم يبدأ بالاضمحلال (Degeneration) في نهاية طور الـ Tel-I بسبب الحاجة إلى مساحة كافية للمتعضيات الأخرى مثل الحبيبات القشرية (**Wassarman، 1996**).

تتحكم عملية الفسفرة ونزعها phosphorylation-dephosphorylation بإتمام الدورة الاختزالية في الخلية من خلال عملية التنظيم المتسلسل لخطوات الانتقال من الطور البيني Interphase إلى M-phase والتي تشتمل على عدة أحداث مثل زوال وتلاشي الغلاف النووي، وتكاثف الصبغيات، وإعادة تنظيم الخلية. إن نموذج الفسفرة البروتينية يتغير مباشرة قبل مرحلة الـ GVBD في الأغنام (**Moor وGrosby، 1985**)، والأبقار (**Kastrop وزملاؤه، 1990**).

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

وتشير الدراسات إلى وجود بعض المنظمات في سيتوبلاسم البويضة تلعب دوراً هاماً في إتمام الإنضاج ومن هذه المنظمات :

أ- الإنزيم المنشط على الانقسام .(MAPK) Mitogen Activated Protein Kinase

يطلق عليه البروتين المنظم خارج الخلية Extracellular Regulated Kinase وهو عبارة عن إنزيم Serin-Therionin Kinase يتم تنشيطه بواسطة عملية الفسفرة Phosphorylation في لحظة بدء النضج لدى مختلف الأنواع، كما في الماعز (**Dedieu وزملاؤه، 1996**). نوه **Haccard وزملاؤه (1993)** إلى أن آلية تأثير الـ MAPK خلال عملية الإنضاج غير معروفة لحد الآن، ولكن وجد أن تنشيطه يعد ضرورياً لكل من استئناف الانقسام الاختزالي وبقائه في حالة سكون عند مرحلة M-II. من ناحية أخرى أشار **Sun وزملاؤه (1999)** إلى انخفاض فعالية الـ MAPK في البويضات غير الناضجة وعند تكوين البدأتين النوويتين الذكرية والأنثوية بعد الإخصاب.

ب- العامل المنشط للإنضاج Maturation Promoting Factor (MPF)

وهو عبارة عن بروتين يتكون من وحدتين ثانويتين الأولى CatalyticSubunit (P^{34cdc2})، والثانية cyclin B (**Labbe وزملاؤه،1989 ; Hue وزملاؤه،1997**). ونوه **Dedieu وزملاؤه (1996)** إلى أن تنشيط هذا العامل يعد مفتاحاً للدخول في طور الـ M-phase، إذ يعمل الـMPF عند الإنضاج على تنظيم الأحداث الخلوية، يوجد الـ MPF في الماعز والأغنام كما هو الحال في بقية الثديات في حالتين أثناء إنضاج البويضات منها الفعالة والأخرى غير الفعالة. فقد وجد **Trounson وزملاؤه (2001)** أن الحالة الفعالة للـ MPF تلاحظ قبل أو مرافقة لمرحلة الـ GVBD، ويزداد مستواها حتى الوصول إلى مرحلة الـ M-I، وبعدها تنخفض خلال الانتقال بين طور الـ Anaphase حتى الوصول إلى طور الـ Telophase، ثم تعاود فعالية الـ MPF بالارتفاع ثانية حتى بلوغ البويضة مرحلة الـ M-II، أما الحالة غير الفعالة للـ MPF فتحدث خلال الانتقال من مرحلة Anaphase إلى مرحلة Telophase وكذلك عند الإخصاب.

جـ-الادينوزين أحادي الفوسفات الحلقي cAMP) Cyclic Adenosine (Monophosphate

أشار **Tsafriri وزملاؤه (1982)** إلى أن الـ cAMP يلعب دوراً فيزيولوجياً مثبطاً للانقسام الاختزالي حيث ينتقل من الخلايا الركامية Cumulus Cells عن طريق الجسور الرابطة

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

gap junction (gj)، وبما أن هرمون الـ LH له دور في تفكيك الارتباطات بين الخلايا الركامية والبويضة مما يحول دون وصول **cAMP**، مما يحفز استئناف الانقسام الاختزالي الأول، كذلك أشار **Wassarman (1996)** إلى اشتراك cAMP في استمرارية بقاء الانقسام الاختزالي في مرحلة السكون حيث أن هبوط مستواه داخل الخلية يعتبر بمثابة إشارة لتحفيز البويضة للدخول في تعاقب الانقسام الاختزالي. وبشكل عام ينخفض مستوى cAMP داخل البويضة عند دخولها مرحلة الـ GVBD.

1- الإضافات المهمة لإنضاج البويضات مخبرياً

أ- المصل **Serum**

أكد **Totey وزملاؤه (1993)** أن جميع الأوساط الزرعية المستعملة في إنضاج وإخصاب البويضات مخبرياً يتم تزويدها بالمصل البقري، كونه يحتوي على كميات من عوامل النمو، والهرمونات، و عوامل أخرى. استنتج **Motlik وFulka (1986)** أن المصل البقري يحتوي على مكونات تلعب دوراً كبيراً، وهاماً، وأساسياً أثناء فترة إنضاج البويضات تكتسب البويضة خلالها قدرتها التطورية، فيمنع المصل حدوث تصلب النطاق الشفاف Zona Hardening أثناء إنضاج البويضات، كما يساعد النطاف على اختراق البويضة بعد الإنضاج في الوسط الزرعي. وأشار **O'Callaghan وزملاؤه (2000)** إلى عدم تشكل الجسم القطبي الأول للبويضات المنضجة مخبرياً مالم يتم إضافة زلال المصل البقري Bovine Serum Albumin (BSA) والهرمونات إلى وسط الإنضاج إذ وجد أن أفضل كمية من الـ BSA يمكن إضافتها هي 6 مايكروغرام/مل.

ازدادت الفائدة من استخدام المصل الجنيني للعجول Fetal Calf Serum (FCS) في الأوساط الزرعية بسبب احتوائه على بعض منظمات النمو غير المعروفة Undefined Growth Promoting Components مثل الـFutin الذي لا يوجد في مصل الحيوانات البالغة (**Allen وزملاؤه، 1982**)، وأيضاً عدم احتوائه على بعض الهرمونات والمواد المناعية التي تعيق تطور البويضات مخبرياً (**Wright و زملاؤه، 1976**).

إن مصل الدم المأخوذ من حيوانات في طور الشبق يصلح لتهيئة بيئة مشابهة للظروف الموجودة داخل الجسم (**Eppig و Schroeder، 1986**). من ناحية أخرى توصل**Pinyopummintr و Bavister (1991)** إلى أن للمصل دوراً تثبيطياً للانقسام الاختزالي الأول مؤديا إلى توقفه، بينما تزداد أهميته بعد مرحلة الكيس الأصلي (Blastocysts)

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

ب- الهرمونات **Hormones**

تكمن أهمية الحاثات المنسلية (حاثات القند) Gonadotropin Hormones في تأثيرها في نشاط المبايض من خلال دخولها كعامل ضروري في عملية إنتاج البويضات القابلة للإخصاب **(زكريا و سلهب، 1982 ; المزيد، 1993)**.

وجد عند الارتفاع المفاجئ لهرمون الـ LH قبل الاباضة حصول تغيير في تركيز العديد من الستيرويدات والمركبات غير الستيرويدية التي تساعد على إنضاج البويضة (**Apa وزملاؤه ،1995**). واعتبر **Moor وزملاؤه (1980**) أن الـ LH ضروري لاستئناف الانقسام الاختزالي للبويضات قبل الاباضة. أشار **Donaldson وزملاؤه (1965**) إلى أن الارتفاع المفاجئ لهرمون الـ FSH (Follicle Stimulating Hormones) يشترك بصورة رئيسة بتنظيم النمو من خلال تنشيط الانقسام المباشر(Mitotic activity)، وتصنيع البروتينات (ProteinSynthesis) في الحويصلات المبيضية الصغيرة Antral follicle، كذلك يعتبر وجوده عامل أساسي لإنتاج الاسترادايول، و يلعب دوراً داعماً للأحداث الفيزيولوجية المرافقة لعملية الإباضة. لقد انتشر استخدام كل من هرمون الـ FSH، و LH، و الاسترادايول كإضافات للأوساط الزرعية من اجل زيادة معدل إنضاج البويضات مخبرياً (**Fukui وزملاؤه، 1982**)، وتبين أن إضافة تلك الهرمونات إلى وسط الإنضاج يأتي من دورها في استئناف عملية الإنضاج داخل الجسم، كما أنها تلعب دورا مهما في عملية تصنيع البروتينات التي تحتاجها البويضة خلال عملية الإنضاج، والإخصاب، والانقسامات الخلوية اللاحقة (**Warnes وزملاؤه، 1977**)، إضافةً إلى تأثيرها في تمدد الخلايا الركامية (**Gordon، 1994**)، لقد حدد **Avery وزملاؤه (1998)** النسبة الأفضل الواجب إضافتها إلى الأوساط الزرعية الخاصة بالإنضاج من هرموني الـ LH:FSH بـ 1:2. بين **Sutton-McDawallوزملاؤه (2004)** الدور الهام لهرمون الـ FSH وتأثيره في تمدد الخلايا الركامية، إذ يعد المسؤول عن نمو وتمايز الحويصلات بينما يساهم هرمون الـ LH في السيطرة على تصنيع الستيرويدات الحويصلية كما ان الارتفاع في تركيز هرمون الـ LH الذي يظهر خلال المرحلة النهائية للطور الحويصلي في الأغنام يرافقه انخفاض في مستوى هرمون FSH في البلازما، مما يساهم في التطور النهائي للبويضة ووصولها إلى مرحلة الاباضة (**Baird وزملاؤه، 1976**).

وجد **Romero-Arredondo** و **Seidel (1996)** أن إضافة هرمون الـFSH إلى الأوساط الزرعية يزيد من القدرة الاخصابية للبويضات المنضجة مخبرياً كما لوحظ تمدد اكبر للخلايا الركامية أثناء الإنضاج المخبري بوجود الاسترادايول وLH. بينما وجد**Yang وزملاؤه**

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

(**1993**) معدلات إنضاج مخبري عالية حتى مرحلة M-II للبويضات سواء بوجود هرمون الـ FSH أو عدم وجوده في الأوساط الزرعية. واثبت **Saeki وزملاؤه (1990)** أن هرمون الـ FSH المحضر تجارياً يمكن أن يستخدم بنجاح في إنضاج بويضات الأبقار مخبرياً وبالتالي الحصول على معدل عالي من البويضات المنقسمة حتى مرحلة الكيس الأصلي. بينما أكد **Wahid وزملاؤه (1992)** أن وجود هرمون الـ FSH في أوساط الإنضاج ضروري وأساسي للإنضاج المخبري للبويضات المستحصل عليها من مبايض النعاج غير البالغة. وأشار **Sanbuissho** و**Threlfall (1990)** إلى أن إضافة مزيج من هرمون الـ FSH و hCG إلى أوساط الإنضاج لم يعط زيادة في معدلات إنضاج بويضات الأبقار مخبرياً، في حين أشار **Goto** و **Iritani (1990)** إلى أن مزيج من هرمون الـ FSH، وLH، وE17β يلعب دوراً هاماً في الإنضاج النووي والسيتوبلاسمي في الأوساط الزرعية المضاف إليها مصل العجول حديثة الولادة.

وجد **Moor** و **Trounson (1977)** أن إضافة هرمون FSH و LH أدت إلى زيادة معنوية في معدلات الإنضاج المخبري لبويضات الأغنام، بينما توصل **Accardo وزملاؤه (2004)** إلى معدل إنضاج بويضات الأغنام بلغ 91.9% عند إضافة هرموني الـ FSH وLH إلى وسط الإنضاج. بين **Guler وزملاؤه (2000)** أن إضافة الاستراديول إلى الأوساط الزرعية لبويضات الأغنام ليس بالأمر الضروري خاصة إذا كانت تلك الأوساط محتوية على السائل الحويصلي. وأوضح **Galli** و**Moor (1991)** أن البويضات يمكن أن تصل إلى الطور M-II في غياب هرمونات القند في أوساط الإنضاج المخبري. على أية حال، إن دور هرمون الـ FSH والاستراديول β-17في الإنضاج السيتوبلاسمي يرجع إلى حقيقة كونهما ينشطان الـ DNA polymerase B لبويضة الأغنام ضمن الحويصلات قبل الاباضة Preovulatory Follicle (**Murdoch وVankirk، 2001**).

أشار **Austin** و**Short (1982)** إلى وجود ارتباط وثيق بين استئناف حدوث الانقسام الاختزالي والمستوى المنخفض من هرمون الاستروجين Estrogen ، ولوحظ وجود علاقة ارتباط موجبة بين الإنضاج المخبري للبويضات وانقسامها في مرحلة الكيس الأصلي وتركيز الاستراديول في السائل الحويصلي لديها (**Cognie وزملاؤه،1995**).

ان دور الاستراديول β-17 في الإنضاج السيتوبلاسمي يكمن في كونه ينشط عمل الإنزيمات الخاصة بالـ DNA لبويضات الأغنام ضمن الحويصلات في مرحلة قبل الاباضة Preovulatory Follicle (**Murdoch وVankirk، 2001 ; Beker وزملاؤه ، 2000**)، ولاحظ **Fukui وزملاؤه (1982)** تأثير الستيرويد ولاسيما الاستروجين في زيادة معدل إنضاج

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

بويضات الأبقار مخبرياً، وان عدم إضافته إلى الوسط الزرعي الخاص بالإنضاج أدى إلى تدني نسب البويضات المخصبة وارتفاع نسب البويضات المنقسمة المتدنية النوعية (**Moor وزملاؤه،1980**) فضلاً عن ذلك فإن الاستروجين يعتبر من المكونات الأساسية للبويضات لإتمام إنضاجها السيتوبلاسمي (**Thibault، 1977**). إن إضافة الـ hCG أو الـ LH مع الاسترادايول 17-β تحفز على استئناف الانقسام الخيطي المباشر و تطور الأجنة حتى مرحلة الكيس الأصلي في الأبقار (**NewComb وزملاؤه،1978**) و الأغنام (**Moor وTrounson، 1977**) .

دُرست أهمية هرمون النمو Growth Hormone (GH) في الإخصاب والانقسام حتى مرحلة الكيس الأصلي في الجرذان (**Apa وزملاؤه ،1995**)، الأرانب (**Yoshimura وزملاؤه ،1993**) والخنازير (**Hagen و Graboski ،1990**)، أشار **Izadyar وزملاؤه (1997)** إلى أهمية هرمون النمو في الإنضاج السيتوبلاسمي. فيما أوضح (**Beavers وIzadyar ،2002**) ان هرمون النمو يحث بعض أوجه الإنضاج السيتوبلاسمي كما يلعب دورا هاما في الإنضاج النووي والذي يؤدي بالنهاية إلى ارتفاع معدل البويضات المنقسمة في مرحلة الكيس الأصلي. كما أوضح **Izadyar وزملاؤه (1997)** علاقة هرمون النمو بالخلايا الركامية التي يقوم بتنظيم فعلها داخل البويضة وخارجها و تسريع إنضاج النواة وزيادة حجم الخلايا الحبيبية.

جـ- السائل الحويصلي Follicular Fluid (FF)

قام **Wise (1987)** بدراسة التركيب المعقد للسائل الحويصلي والمؤلف من المصل و الافرازات المصنعة من قبل خلايا الحويصلة المبيضية، ووجد أن له دور في دعم إنضاج البويضات لاحتوائه على العديد من البروتينات، والأحماض الامينية، والكاربوهيدرات، وهرموني FSH، وLH ، و الستيرويدات مثل الاندروجين، والاستروجين والبروجسترون، بالإضافة إلى غناه بعوامل نمو، والإنزيمات، وعدد من العناصر والأملاح (**Larsen وزملاؤه ،1987**)، وان تلك المواد توفر الوسط الملائم لإنضاج البويضات، كما يلعب السائل الحويصلي دورا في إحداث الإنضاج السيتوبلاسمي والنووي للبويضات وإتمام قدرتها التطورية من خلال أهميته في الإخصاب لاحتوائه على نيوكليوتيد البيورين Purine nucleotide (**Yadav وزملاؤه، 1997**). يحوي السائل الحويصلي قبل الاباضة على عوامل نمو مثل Epidermal Growth Factor (EGF)، وInsolin Like Growth Factor (IGF-I)، و Transforming GrowthFactorα&,β (TGF-α,TGF-β) (**Apa وزملاؤه ،1995**)، و Gonadotropin Releasing Hormones (GnRH) (**Spicer وزملاؤه ،1992**) بتراكيز كافية لتحفيز إنضاج البويضات، و أشار **Behi وPandey (2001)** إلى أن عوامل

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

النمو سالفة الذكر تؤدي دوراً مهماً في عمل الحويصلات المبيضية مثل تكاثر الخلايا وتمايزها وتصنيع الستيرويدات. وأكد **Romero-Arredondo و Seidel (1994)** أن السائل الحويصلي المجموع قبل الاباضة وبعد الارتفاع المفاجئ لهرمون LH يؤدي إلى تمدد الخلايا الركامية لبويضات الأبقار عند الإنضاج المخبري. من ناحية أخرى بين **Freter (1986)** وجود مثبطات للانقسام الاختزالي لبويضات الأبقار المنضجة في السائل الحويصلي، بينما أكد **Tsafriri وزملاؤه (1982)** وجود العامل المانع للإنضاج Oocyte Maturation Inhibitory (OMI) في السائل الحويصلي للأرانب، والهامستر، والإنسان، والأبقار، والأغنام.

د- السيستامين Cysteamine

يعد السيستامين من المركبات التي تنتمي إلى طائفة الأمينوثيولات (aminothiols) ذات الوزن الجزيئي المنخفض ($HSCH_2CH_2NH_2$)، ويلعب دوراً ايجابياً في المحافظة على عمليات الأكسدة (مضاد أكسدة) بأقل مستوياتها في بويضات الأبقار(**Balasubramanian و Gyu-Jin Rhob، 2007**)، وفي بويضات الفئران (**Guérin وزملاؤه، 2001**). بين **Ali وزملاؤه (2003)** أهمية مضادات الأكسدة في أوساط الإنضاج والإخصاب المستخدمة في إنتاج الأجنة مخبرياً. فمن المعروف حساسية البويضات لأنواع الأكسدة الرجعية . ROS (Reactive Oxygen Species) والتي تؤدي إلى حدوث تفاعلات كيميائية ضارة للخلايا وللتغلب على تلك المشكلة في الإنضاج والإخصاب المخبري لابد من إضافة مضادات الأكسدة مثل فيتامينات A، وC، وE، والحمض الاميني Cystein، والسيستامين. في حين أوضح **Cetica وزملاؤه (2001)** أن البويضات تكون قادرة على إفراز إنزيمات لها القدرة على مقاومة ظاهرة الأكسدة مثل superoxyde dismutase وcatalase، كذلك إنتاج مركبات داخل النسيج الخلوي لها القدرة على تقليل تلك الظاهرة كالغلوتاثيون (GSH)(**De Matos وFurnus، 2007**)، إن الحث على إنتاج تلك الأنظمة البروتينية يجعل البويضات قادرة على مواجهة ظروف الإنضاج والإخصاب المخبري، كما أن إضافة السيستامين إلى أوساط الإنضاج له علاقة وطيدة بتمثيل الغلوتاثيون، إذ يؤدي إلى زيادة تراكيزه وبالتالي زيادة القدرة التطورية للبويضات المحضنة (**Khatir وAnouassi، 2006**)، بالإضافة إلى ذلك تلعب الخلايا الركامية دورا هاماً في زيادة تمثيل الغلوتاثيون لذا فإن حث الخلايا الركامية على تمثيل الغلوتاثيون يلعب دوراً هاما في تقليل مخاطر الأكسدة وحماية البويضات منها (**Luciano وزملاؤه ،2005**). كما أوضح **Perrault وزملاؤه (1988)** ارتفاع في نسب الغلوتاثيون خلال نمو وتطور البويضة في المبيض وزيادة هذه النسب كلما اقترب وقت الاباضة، أما في الإخصاب المخبري فيمكن تعويض عوز الغلوتاثيون

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

عن طريق إضافة السيستامين. أشارت نتائج **Earl وزملاؤه (1997)** و **Taneja وزملاؤه (1998)** إلى أن إضافة الغلوتاثيون في أوساط استعداد وإنضاج النطاف أدت إلى زيادة معدلات البويضات المنقسمة التي في مرحلة الكيس الأصلي عند الأبقار، كما أن إضافته إلى أوساط الإخصاب تجعله يلعب الدور الواقي لأغشية النطفة وحمايتها من الجذور الحرة في المحلول مما يزيد من معدلات الإخصاب والانقسام مخبرياً. بين **Chance وزملاؤه (1979)** أن تمثيل الغلوتاثيون يعتمد وبشكل كبير على مدى توفر الحمض الاميني Cysteine في أوساط الإنضاج، في حين أوضح **Issels وزملاؤه (1988)** أن تمثيل الغلوتاثيون في ظروف الإنضاج و الإخصاب المخبري يمكن أن يتوقف بسبب انخفاض نسبة الحمض الاميني Cysteine في الوسط TCM199 من جهة وتحول الحمض الاميني Cysteine إلى الحمض الاميني Cystine بواسطة الفعل التأكسدي من جهة أخرى، لذلك فإن إضافة السيستامين إلى الأوساط الزرعية يؤدي إلى زيادة نسب الحمض الاميني Cysteine الأمر الذي ينجم عنه زيادة في تمثيل الغلوتاثيون في وسط الإنضاج. أكد **DeMatos وزملاؤه (1995)** أن إضافة السيستامين إلى الوسط الزرعي يزيد من تركيز الغلوتاثيون في بويضات الأبقار ويزيد من نسبة الأجنة في مرحلة الكيس الأصلي، كما بين **Grupen وزملاؤه (1995)** أن إضافة السيستامين إلى الأوساط الزرعية أدت إلى تموضع أعداد قليلة من النطاف حول البويضات الناضجة عند الخنازير والهامستر(**Kito وPavister، 1997**) مع ملاحظة وجود نسب عالية من البويضات المنقسمة لدى الأغنام والخنازير (**Yamauchi وNagai، 1999**). كما أوضح **Karami وزملاؤه (2010)** أن إضافة السيستامين إلى الأوساط الزرعية الحاوية على IGF-I أدت إلى زيادة في معدلات البويضات التي وصلت إلى مرحلة الكيس الأصلي عند الأغنام، بينما لم يلحظ فرق معنوي في نسب الإنضاج، والإخصاب، والانقسام المخبري اللاحق. وأوضح **DeMatos وزملاؤه (2000)** أن إضافة السيستامين إلى أوساط الإنضاج يزيد من معدلات البويضات في مرحلة الكيس الأصلي في الأبقار و(**DeMatos وزملاؤه ، 2002a**) في الأغنام، و(**Gasparrini وزملاؤه ،2003**) في الجاموس، و(**DeMatos وزملاؤه ،2003**) في الفئران. ودلت نتائج **Rodreguez-Gonzalez وزملاؤه (2003)** أن إضافة 100مايكرومولر من السيستامين في أوساط إنضاج بويضات إناث الماعز غير البالغة أدى إلى زيادة معنوية في معدلات تشكل البداأتين النوويتين الذكرية والأنثوية في مرحلة الإخصاب المخبري.

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

2- متطلبات الإنضاج المخبري

لا شك أن إنضاج البويضات وإخصابها مخبرياً يتطلب توفير بعض الظروف الفيزيائية، والكيميائية، والبيولوجية المشابهة لدرجة كبيرة إلى تلك التي تحيط بالخلية أو النسيج داخل الجسم (**Vajta وزملاؤه، 1997**)، ومن المعروف أن بويضات الثديات تكون حساسة بدرجة كبيرة للتغيرات البيئية، وان تحسين الطرائق العلمية المتبعة في تقانة الإنضاج المخبري (IVM) للحصول على بويضات ناضجة لها القدرة على الإخصاب والتطور الجنيني المبكر يعد أمراً ضرورياً (**Nagai ،2001**). لوحظ أن أفضل درجة حرارة لإتمام الإنضاج المخبري لبويضات الأبقار تتراوح بين 38ْ م و 39ْ م باعتبار أن هذه الدرجة الحرارية قريبة من درجة حرارة المستقيم (**Shi وزملاؤه، 1998**)، وأشار **Mermillod وزملاؤه (2006)** إلى أن درجة الحرارة 38.5ْ م تعتبر درجة الحرارة المثلى لإنضاج بويضات المجترات، بينما أفاد **Sharma وزملاؤه(1996)** أن درجة حرارة 39ْ م في إنضاج بويضات الماعز مخبرياً تعتبر هي درجة الحرارة المثلى. وأشار **Drost (2002)** إلى أن الضغط التناضحي(الاسموزي) الأمثل لزرع البويضات وإخصابها خارج الجسم هو 270 –300 ملي اوزمول، بينما حدد **Brackett وزملاؤه (1980)** أن الضغط التناضحي الأمثل لوسط الإخصاب خارج الجسم يكون بين 305 –380 ملي اوزمول. ودلت نتائج **Verbessem وزملاؤه (1988)** أن لدرجة pH تأثيراً في الإخصاب المخبري نظراً لتأثيرها المباشر على العمليات البنائية للبويضة فضلاً عن تأثيرها في الفعاليات الإنزيمية، كما تؤثر في نفاذية الغشاء البلازمي و حدوث ظاهرة الإخصاب المتعدد (polyspermy). ولقد استخدم على نطاق واسع غاز CO_2 بنسبة 5 % في إنضاج البويضات وإخصابها وانقسامها مخبرياً لمختلف أنواع بويضات الثديات كالأبقار، والخنازير، والأغنام، والماعز من اجل الحفاظ على الـ pH المناسب للإنضاج، والإخصاب، والتطور الجنيني المبكر(**Rivera و Hansen، 2001**). وأشار **Fukui (1990)** إلى أن درجة pH الخاصة بوسط الإنضاج، ووسط استعداد النطاف، والإخصاب في الأبقار كانت 7.4 ، و7.4، و7.8 على التوالي، وفي الأغنام 7.3 ، و7.3، و7.7 على التوالي (**Huneau وزملاؤه ، 1994**)، وفي الماعز 7.35 ، و7.3 و 7.7 على التوالي (**DeSmedt وزملاؤه ، 1992**).

للرطوبة النسبية دوراً كبيراً في الحفاظ على مستوى الماء داخل الوسط الزرعي وعدم تبخره 95% وبالنتيجة الحفاظ على pH الوسط الزرعي (**Xu وزملاؤه ،1986**). وأشار **Xu وزملاؤه (1986)** أيضاً إلى أن الوقت اللازم لإنضاج بويضات الأبقار مخبرياً يستغرق 24 ساعة وهي المدة الكافية لتكوين الجسم القطبي الأول، وفي الأغنام تحتاج البويضات 25 ساعة للإنضاج

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

(**Dziuk، 1965**)، أما في الماعز فقد أكد **DeSmedt وزملاؤه (1992)** أن بويضات الماعز تحتاج إلى 27 ساعة لإتمام الإنضاج، في حين أشار **Sharma وزملاؤه (1996)** أن الوقت اللازم للإنضاج النووي لبويضات الماعز مخبرياً هو 32 ساعة، بينما حصل **Samake وزملاؤه (2000)** على نسبة إنضاج 100 % عند حضن البويضات المستخلصة من حويصلات مبيضية أقطارها بين 2–6 مم لمدة 24 ساعة.

ثانياً – استعداد النطاف واكتسابها النضج النهائي Sperm Capacitation

1- إنضاج النطاف داخل جسم الأنثى (طبيعياً) In Vivo Sperm Capacitation

تبقى نطاف الثديات في بيئة فيزيولوجية محددة أثناء تخزينها في البربخ لمدة من الزمن قبل أن يتم قذفها عند التزاوج، ويتم خلال تلك الفترة ارتباط بعض البروتينات مع الغشاء البلازمي للنطاف (**Hafez وHafez، 2000**)، و تكون في تلك الحالة غير قادرة على إخصاب البويضات، ولكن بعد فترة من إيداعها داخل القناة التناسلية الأنثوية تكتسب المقدرة على الالقاح بسبب خضوعها لعملية الاستعداد (Capacitation) التي تتضمن إزالة الغلاف البروتيني المحيط برأس النطفة بواسطة إنزيمات حالة للبروتين (**Austin و Short، 1982**). تستغرق تلك العملية نحو ست ساعات داخل الجهاز التناسلي الأنثوي في الأبقار (**Gordon، 1994**).

تكتمل عملية الاستعداد بارتباط النطاف مع مجموعة من السكريات المتعددة Polysaccharides توجد داخل الجهاز التناسلي الأنثوي تسمى الـ Glycosaminoglycan (GAGs)، ويعتقد **First و Parrish (1987)** أن استعداد النطاف داخل الجهاز التناسلي الأنثوي يتم تحت سيطرة هرمونية ولاسيما البروجسترون الذي يعمل على تحفيز عملية الاستعداد.

2- إنضاج النطاف مخبرياً In Vitro Sperm Capacitation

أشار **Duran (1998)** إلى أن عملية إزالة البروتينات وافرازات الغدد المساعدة المغطية لغشاء النطفة في السائل المنوي تعد جزءاً من عملية الاستعداد التي تجري للنطف مخبرياً وتحصل بشكل مشابه لما يحصل طبيعيا داخل الجسم، دلت نتائج **Parrish وزملاؤه (1988)**على أن الهيبارين وهو من مجموعة الـ GAGs له القدرة على ربط البروتينات الموجودة في البلازما المنوية، ما يحسن من عملية الاستعداد مخبرياً، كما ويساعد الهيبارين على حث التغيرات

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

الفيزيولوجية الضرورية للحصول على تفاعل الجسيم الطرفي، كما أن الغلوكوز في الوسط الزرعي يثبط عمل الهيبارين لذلك استعاضت عنه العديد من المدارس بالبايروفيت واللاكتات كمصدر للطاقة (**Keskintepe وزملاؤه ، 1998**). أشار **Lenz وزملاؤه (1983**) إلى قدرة الخلايا الركامية على إنتاج الـ GAGs خاصة عند تحفيزها بواسطة هرمون الـ FSH، وتشير نتائج **Dale و Elder (1997)** إلى إمكانية استخدام السائل الحويصلي في تنشيط ظاهرة استعداد النطاف لاحتوائه على احد مركبات GAGs الموجودة في المبيض، والرحم، وقناة البيض والذي يزيد من ايض النطاف وارتفاع وتيرة الحركة التقدمية من خلال تقليل الـ ATP وارتفاع الـ c-AMP في النطاف.

وجد**Yadav وزملاؤه (1998)** ارتفاعاً في نسبة الإخصاب (85%)عند إضافة مصل دم النعاج الشبقة Estrus Sheep Serum (ESS) إلى الوسط المستخدم لاستعداد النطاف، أما **Cox وزملاؤه (1994) و Keskintepe وزملاؤه (1998)** استخدموا الوسط الزرعي TALP في عملية استعداد النطاف مع إضافة الهيبارين والكافيئين. بينما استعمل كل من **العبيدي (1989) والطائي (2003)**الوسط الزرعي (TCM-199) مضافا إليه مصل جنين العجول، ووجد عند إضافة BSA (Bovine Serum Albumin) والسائل الحويصلي إلى وسط الاستعداد فإنها تعمل على إزالة الكوليسترول (Cholestrol) والزنك (Zinc) من الغشاء البلازمي للنطفة (**Duran، 1998**). أشار **Lui وزملاؤه (1977)** إلى أن زلال المصل يساعد على حدوث تفاعل الجسيم الطرفي كما يساعد أيضاً على استعداد واستمرارية حركة وحيوية النطاف. أما **Lorraine و Bavister (1982)** استخدما Polyvinyl Alcohol بدلا من المصل في استمرار حيوية النطاف وحركتها، وجد **Cheng وزملاؤه (1986)** دوراً هاماً لدرجة pH في أوساط استعداد نطاف الكباش من خلال إزاحة البروتينات المرتبطة عندما تراوحت قيمها بين 7.8 و 8.

تتأثر عملية اختراق النطاف للبويضات لارتفاع أو انخفاض درجات الحرارة أثناء عملية استعداد النطاف، لذلك من الضروري الحفاظ على درجة الحرارة بشكل ثابت عند استعداد النطاف مخبرياً بما يتناسب والنوع الحيواني (**Sirard و Lambert، 1986**).

ثالثاً- تفاعل الجسيم الطرفي **Acrosome Reaction** (AR)

بعد حصول الاباضة، فان النطاف المنضجة سوف ترتبط بالبويضة وتبدأ عمليات تفاعل الجسيم الطرفي التي تساهم في زيادة قدرة النطاف على اختراق البويضة حيث توجد مستقبلات

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

على رأس النطاف (Sperm Receptors) ومواقع الارتباط على البويضة (Egg-binding). يوصف تفاعل الجسيم الطرفي من الناحية الشكلية باتحاد الغشاء البلازمي للنطفة مع الغلاف الخارجي للجسيم الطرفي في مواقع عديدة مكونا حويصلات Vesiculation (فجوات) صغيرة متعددة على النصف الأمامي لرأس النطفة والتي تعمل كمنافذ لمكونات الجسيم الطرفي كالإنزيمات بما فيها إنزيم الهيالورونيداز، وإنزيم شبيه التربسين أو الاكروسين (acrosin) (**Wassarman، 1993**)، ويعتبر ايون الكالسيوم المحرك الرئيسي الذي يساعد على تفاعل الجسيم الطرفي عند الثديات (**Hafez وHafez، 2000**)، وذلك نتيجة لدخوله وتجمعه في غطاء رأس النطفة مترافقا مع دخول كميات من الماء من الخارج، مما يسبب انتفاخ في غطاء رأس النطفة (Acrosome swelling) وبالتالي تشكل الفجوات (**Crozet، 1984**). ومن الممكن أن يستحث تفاعل الجسيم الطرفي مخبرياً من خلال رفع تركيز الأس الهيدروجيني (pH) في الوسط إلى 9–9.5 متيحاً بذلك دخول ايونات الكالسيوم إلى داخل رأس النطفة (**Bondioli وWright، 1983**).

رابعاً– الإخصاب Fertilization

تشتمل عملية الإخصاب عند العديد من الثدييات على عدة مراحل يمكن إجمال تسلسل أحداثها بارتباط النطاف بالنطاق الشفاف ومن ثم إتمام تفاعل الجسيم الطرفي، ثم حدوث اختراق للنطاق الشفاف و اندماج نطفة واحدة مع البويضة ومنع دخول نطاف أخرى، وإطلاق الجسم القطبي الثاني Second Polar Body (2PB)، وظهور البدائتين النوويتين الذكرية والأنثوية (**Wassarman، 1993**).

1 – الإخصاب الطبيعي In Vivo Fertilization

أشار **Ignotz وزملاؤه (2001)** إلى أن ملايين النطاف تصل بعد التلقيح إلى القناة التناسلية في الثديات، لكن عدة آلاف منها تصل البرزخ Isthmus في قناة البيض، حيث تكون مستودعاً لتجمع النطاف كما في الأبقار (**Hunter وWilmnt، 1984**)، والأغنام (**Hunter وNicol 1983**)، إن تجمع النطاف في تلك المنطقة من الجهاز التناسلي يساهم في استعداد النطاف وزيادة حركتها Hyperactivation Motility (**Dobrinski وزملاؤه، 1999**). بعدها تنتقل النطاف إلى منطقة الإخصاب، الامبولا (Ampulla) ضمن قناة البيض حيث يتم الإخصاب (**Hafez وHafez، 2000**).

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

2- الإخصاب المخبري In Vitro Fertilization (IVF)

طُبقت التقانات التي استخدمت في الإخصاب خارج الرحم (المخبري أو خارج الجسم أو الإخصاب في الزجاج (**test- tube conception**)) على الأبقار مثلما طُبقت على المجترات الصغيرة كالأغنام والماعز، إذ استخدم وسط الإخصاب TALP بالإضافة إلى وسط لاستعداد وإنضاج النطاف (**Parrish وزملاؤه ،1986**) تقليداً لعملية تمكين وإنضاج النطاف طبيعياً في الجهاز التناسلي الأنثوي.

أوضح **Mermillod وزملاؤه (2006)** إمكانية استخدام السائل المنوي المجمد على نطاق واسع في الإخصاب المخبري وذلك عن طريق اغناء وسط الإخصاب بالنطاف الناضجة حيث يترك عادة المجال للنطاف التي تكون في قاع الأنبوب بالسباحة إلى الأعلى (swimming up) وبالتالي يكون الجزء العلوي محتويا على نطاف ذات حيوية جيدة، تخضع تلك النطاف بعد جمعها إلى عملية تحضين لوقت معين، ويُمدد تركيزها في وسط الإخصاب ليتراوح بين 0.5–2 مليون نطفة/مل حسب نوع الحيوان، لان التراكيز العالية من النطاف في وسط الإخصاب قد تؤدي إلى ازدياد ظاهرة الإخصاب المتعدد وبالتالي لابد من إيجاد تركيز يحقق معدل إخصاب عالي وبنفس الوقت يخفض من حالات الإخصاب المتعدد. أشار **Comizzoli وزملاؤه (2003)** إلى حصوله على معدلات إخصاب وانقسام مختلفة مخبرياً عند استخدامه لذكور متعددة، كما أشار أيضاً إلى أن الذكور التي استخدمت سوائلها المنوية في الإخصاب المخبري قد أعطت معدلات إخصاب متشابهة ولكن كانت معدلات الأجنة في مرحلة الكيس الأصلي مختلفة، ما يستوجب ضرورة الاهتمام بفحص واختبار الذكور وانتخابها ليس لناحية مقدرتها الاخصابية فقط وإنما لتأثيرها في التطور الجنيني المطلوب.

خامساً – الانقسامات الخلوية Cell divisions

1- الانقسامات الخلوية داخل الجسم In vivo cell divisions

أشار **Moore (1988)** إلى مجموعة من الأحداث المتعلقة بالانقسامات الخلوية داخل الجسم أهمها حدوث الإخصاب الطبيعي في منطقة الامبولا (Ampulla) بعد 12 – 24 ساعة من الاباضة في الإنسان إذ تقوم النطفة بتحفيز البويضة على استئناف الانقسام الاختزالي الثاني (Second Meiotic Division) مؤديةً إلى اكتمال نضج البويضة، و ظهور الجسم القطبي

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

الثاني، ثم ظهور البداأتين النووية الذكرية والأنثوية و اندماجهما مع بعضهما ليكتمل العدد الصبغي وتصبح الخلية مضاعفة الصيغة الصبغية Diploid Cell (2n)، وعند انتقال البويضة المخصبة (Zygote) ضمن قناة البيض تحدث الانشطارات (Cleavages) أو الانقسام الخيطي المباشر مكونة البلاستوميرات (Blastomers) التي تستمد احتياجاتها من المواد الغذائية الضرورية اللازمة للانقسام الخلوي من مفرزات قناة البيض.

تصغر الخلايا الجذعية الجنينية (Blastomers) بالحجم بعد كل انقسام وصولا إلى ما بعد مرحلة 16 خلية التي تعرف بالتويتة (Morula) مع استمرار إحاطتها بالنطاق الشفاف. وعند دخول التويتة إلى تجويف الرحم بعد 5-7 أيام من الإخصاب، وحسب النوع الحيواني، يكون الجنين قد وصل إلى مرحلة الكيس الأصلي (**Moore، 1988**).

2- الانقسامات الخلوية مخبرياً In vitro cell divisions

تتطور أجنة المجترات في ظروف الزرع المثلى للبويضات حتى المرحلة 8-16 خلية ولعل تلك المراحل كانت تعبر عن أول نجاح لإنتاج الأجنة مخبرياً من خلال استعمال الإضافات الداعمة للوسط الزرعي TCM199 (**Eyestone وزملاؤه،1991**).

استنبط لاحقاً أوساط زرعية جديدة أكثر ملائمة لمتطلبات التطور الجنيني والانقسامات اللاحقة دون الحاجة إلى الأوساط الزرعية الداعمة، ولعل أهمها هو الوسط الزرعي SOF (Sythensis Oviduct Fluid) (**Fukui وزملاؤه، 1991**)، الذي استمد تركيبه أساساً من تركيب السائل الحويصلي البقري. وقد اثبت هذا الوسط كفاءة عالية لدى استخدامه في الانقسام المخبري لبويضات المجترات الصغيرة كالأغنام والماعز (**Gardner وزملاؤه، 2000**).

أوضح **Mermillod وزملاؤه (2006)** صعوبة التوصل إلى بويضات منقسمة ابعد من مرحلة التويتة لدى الغزال الأحمر أثناء استخدام الوسط SOF بالمقارنة مع الوسط oOEC (Ovine Oviduct Epithelial Cells) الذي أعطى معدلات مرتفعة من البويضات المنقسمة في مرحلة الكيس الأصلي، وكذلك معدلات مرتفعة من الإناث الحوامل التي زرعت فيها الأجنة. أفاد **Rivera وHansen (2001)** بأن أي تغير في درجة الحرارة يؤدي إلى توقف الفعاليات الحيوية في البويضة المخصبة مع حصول تشوهات خلال المراحل الجنينية المبكرة، وبالتالي لابد من نقل البويضة المخصبة إلى الوسط الزرعي الخاص بتطور الأجنة وتغطيته بزيت البارافين Paraffin Oil لمنع التبخر وتقليل التلوث، مع الأخذ بعين الاعتبار الحفاظ على ثبات درجة حرارة الوسط الزرعي، إن ارتفاع درجة الحرارة يؤثر في تخليق البروتينات وعمليات التركيب المطلوبة مع

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

التقليل في معدل النمو الجنيني والتأثير على الفعاليات الإنزيمية (**AL-Katanani وزملاؤه ،2002**). واقترح **Fukui وزملاؤه (1996)** ضرورة تجديد الوسط الزرعي كل 48 ساعة خلال الـ IVC لتجنب التسمم بالامونيا (amonium toxicity) خاصة عند إضافة الأحماض الامينية إلى الأوساط الزرعية.

سادساً- العوامل المؤثرة في إنتاج الأجنة مخبرياً

1- الموسم Season

أوضح **المزيد (1986)** أن موسم التناسل عند الأغنام يرتبط بالعوامل المناخية بالدرجة الأولى، كما أوضح **زكريا و سلهب (1991)** أن فترة الفصل التناسلي و الاباضة لأي سلالة من الأغنام تختلف حسب الموقع الجغرافي، والظروف البيئية، والحالة الغذائية لذا يمثل النشاط الجنسي الفصلي وفترته قيما متوسطة بالإضافة إلى الانحرافات عن تلك المتوسطات.

وجد **Dutt (1963)** و **AL-Katanani وزملاؤه (2002)** أن تأثير الإجهاد الحراري قبل التلقيح يؤدي إلى انخفاض الخصوبة لدى الأبقار والأغنام بسبب القصور في تطور البويضة. كما أشار **Rocha وزملاؤه (1998)** و **Rutledge وزملاؤه (1999)** إلى إمكانية إعطاء الدليل على القدرة التطورية للبويضة من خلال تقدير نسبة التطور بعد الإخصاب المخبري (IVF)، ولاحظوا أنها تكون منخفضة في الصيف عما هو عليه في الشتاء، لأن الإجهاد الحراري يؤثر سلباً في نمو الحويصلات الرئيسة (**Badinge وزملاؤه، 1993**)، مسبباً عدم نمو الحويصلات السائدة ومؤديا إلى حصول انخفاض في نمو الحويصلات الثانوية (**Wolfenson وزملاؤه ،1995**)، كما أن ارتفاع الحرارة المتزامن مع حصول الإجهاد لدى الأبقار يثبط وظائف البويضة مباشرةً كما هو الحال في بقية خلايا الجسم. أشار **Edwards وHansen (1997)** إلى انه من المحتمل أن يكون تأثير ارتفاع الحرارة ضارا على نمو البويضة وتصنيع البروتين وتكوين المستنسخات الضرورية لتتابع التطور الجنيني، وأكد **Wolfenson وزملاؤه (1995)** أن الإجهاد الحراري يؤثر في تطور الحويصلة المبيضية من خلال تقليل إنتاج هرمون الستيرويد مما يعطل نمو البويضة.

أوضح **الطائي (2003)** في دراسة على الماعز تأثير فصل السنة في الإنضاج المخبري إذ كانت أعلاها خلال فصلي الصيف والخريف ، كذلك عند دراسة الإخصاب الخارجي كما أظهرت نتائجه وجود اختلافات معنوية بين فصول السنة، وعدم قدرة البويضات على الانقسام خلال فصل الشتاء مقارنة ببقية فصول السنة.

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

2- قطر الحويصلة المبيضية و البويضة Follicle Size and Oocyte Diameter

أشارت نتائج **Kruip وزملاؤه (2000) و Lonergan وزملاؤه (1994)** إلى العلاقة بين حجم الحويصلة المبيضية والقدرة التطورية للبويضات إذ وجدوا أن قدرة البويضات التطورية تزداد بازدياد حجم الحويصلة، فيما أشارت نتائج **Hendriksen وزملاؤه (2000) و Yang وزملاؤه (1998)** إلى معدلات مقبولة من البويضات المنقسمة في الأبقار والتي منشؤها حويصلات مبيضية بقطر 2–3 مم مقارنة مع البويضات التي منشؤها حويصلات مبيضية >3 مم. كما وجد **Yousaf** و **Chohan (2003)** ان معدلات الإنضاج المخبري لدى بويضات الجاموس التي وصلت إلى مرحلة M-II من حويصلات مبيضية بقطر 2–3 مم و3–<4 مم كانت32% مقارنة و 32.7%على التوالي، في حين كانت الفروق واضحة في تلك المعدلات للبويضات المستخلصة من حويصلات مبيضية بقطر 4–6 مم ومن 6–8 مم (67.1% مقارنة مع79.1%). وفي الأغنام كان هناك تباين في معدلات الإنضاج المخبري للبويضات المستخلصة من حويصلات مبيضية بقطر >5 مم مقارنة مع البويضات في الحويصلات المبيضية التي بقطر 2–5 مم (**Crozet وزملاؤه، 1995**). وفي الأبقار أعطت البويضات المستخلصة من حويصلات مبيضية قطرها أكثر من 6 مم نسبة عالية في الوصول إلى مرحلة الكيس الأصلي مقارنة مع الحويصلات الأصغر منها (**Tan و Lu، 1990**). أكد **Mariana و Machado (1976)** أن التجويف الحويصلي في الأبقار يبدأ تكوينه في حويصلات أقطارها 0.12 و 0.16 مم، بينما توصل **Marion و Gier (1971)** إلى أن التجويف الحويصلي يبدأ تكوينه عند حويصلات مبيضية أقطارها 0.7 مم، في حين لاحظ **Lussier وزملاؤه (1987)** أن التجويف الحويصلي يتطور بمستوى ثابت عند قطر 0.14 – 0.28 مم، أشار **Barnes وزملاؤه (1991)** إلى قدرة البويضات المستخلصة من حويصلات مبيضية صغيرة الحجم على إنضاج النواة وبقاء السيتوبلاسم غير ناضج مقارنة مع البويضات المستخلصة من الحويصلات المبيضية النامية والناضجة. وأعطت البويضات المستخدمة في برامج إنتاج الأجنة مخبرياً والمأخوذة من حويصلات مبيضية كبيرة ارتفاعاً في عدد الأجنة التي في مرحلة الكيس الأصلي مقارنة بالبويضات التي مصدرها من حويصلات مبيضية صغيرة كما في الأبقار (**Pavlok وزملاؤه، 1992**)، والأغنام (**Cogine وزملاؤه، 1998**)، والماعز (**Crozet وزملاؤه، 1995**). أكد **Luissier وزملاؤه (1987)** أن البويضات تنمو داخل الحويصلات المبيضية ببطء ولفترة قد تستمر لـ 6 اشهر وخلال تلك الفترة تكتسب البويضات قدرتها على الإنضاج النووي من خلال التفاعل بينها وبين طبقة الخلايا الحبيبية، كما تتم إنضاجها السيتوبلاسمي خلال تلك الفترة (**Miyano، 2003**)، وقدرتها على

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

التطور الجنيني المبكر (**Kruip وزملاؤه، 2000**) ولاشك أن مجمل العمليات السابقة مرتبطة ارتباطاً وثيقاً بقطر الحويصلة المبيضية.

تتمكن بويضات الماعز من حويصلات مبيضية بقطر 0.5 – 0.8 مم من استئناف الانقسام الاختزالي وتصل إلى الطور M-I عند قطر 1 – 1.8 مم (**DeSmedt وزملاؤه، 1994**)، لوحظ أن 86 % من بويضات الحويصلات ذات أقطار اكبر من 2 مم تصل إلى الطورM-II (**DeSmedt وزملاؤه، 1992**)، واستنتج **Blondin** و**Sirard** (**1994**) أن أقطار الحويصلات تعتبر مؤشرا أكثر أهمية على القدرة التطورية للبويضة من شكلها أو حالتها الصحية (Health Status)، وبشكل عام يتم انتخاب الحويصلة المبيضية بعد الذبح من خلال الصفات الشكلية نتيجة الارتباط الوثيق بين شكل الحويصلة المبيضية ووظيفتها (**Kruip وDieleman، 1985**). وأكد **Crozet وزملاؤه (1995)** على وجود علاقة ايجابية بين قطر الحويصلة المبيضية والقدرة التطورية للبويضات مع تطور الجنين، حيث لوحظ أن ما نسبته 56% و96 % من بويضات الماعز من حويصلات مبيضية 2 – 3 مم و> 3 مم استطاعت أن تصل إلى طور M-II بعد الإنضاج، بينما وجد أن بلوغ بويضات الماعز إلى مرحلة الكيس الأصلي كان 6 %، و12 %، و 26% ، و41 % لبويضات من حويصلات مبيضية أقطارها 2–3 مم، و3.1 – 5 مم، و > 5 مم ومن حويصلات بعد الاباضة، على التوالي. لم يلاحظ **Arlotto وزملاؤه (1996)** فرقاً معنوياً في معدلات الإنضاج المخبري للبويضات المستخلصة من حويصلات تراوحت أقطارها بين 1 و15 مم عند الأبقار. وقد أشار **Lonergan وزملاؤه (1994)** و **Otoi وزملاؤه (1997)** إلى ارتفاع في نسبة بلوغ البويضات المنضجة والمخصبة مخبرياً إلى مرحلة الكيس الأصلي مع ازدياد قطر البويضة وحجم الحويصلة المبيضية. وجد **Fair وزملاؤه (1995)** أن البويضات تكتسب القدرة التطورية مع زيادة حجم الحويصلة، فيلاحظ أن القدرة التطورية لبويضات الثديات تحدث عندما يكون حجم الحويصلة المبيضية نحو 3 مم والذي يقابله قطر بويضة 110 مايكرومتر في الأبقار، كما أن 23 % من بويضات الأبقار تتوقف عند مرحلة الحويصلة المنتشة (GV) بعد 24 ساعة من الإنضاج المخبري.

تشير نتائج **Lechniak وزملاؤه (2002)** أن القطر الحرج للبويضات لاكتساب قدرتها التطورية والذي يتزامن وجوده في حويصلات مبيضية قطرها اكبر من 3 مم هو 110 مايكرومتر

في دراسة على الجمل العربي بين**Khatir وزملاؤه (2004)** أن الحويصلات المبيضية ذات قطر 4–10 مم تميزت بارتفاع معدل البويضات ذات القطر 120 مايكرومتر. بين **Sirard وزملاؤه (1998)** أن بويضات الأبقار تكتسب القدرة على التطور واجتياز الإنضاج النووي

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

والتطور الجنيني اللاحق بعد أن يبلغ قطرها 110 –120 مايكرومتر. وأوضح **Sato وزملاؤه (1990)** ارتفاع نسبة البويضات ذات الأقطار الكبيرة في الإنضاج المخبري عند الأبقار، في حين وجد أن البويضات تمكنت من اجتياز مرحلة GBVD عند أقطار 91 مايكرومتر، كما لوحظ تشكل الجسم القطبي الأول عند البويضات ذات أقطار 110 مايكرومتر ووجد **Arlotto وزملاؤه (1996)** فرق معنوي في معدلات الإنضاج لبويضات الأبقار المستخلصة والتي تراوحت أقطارها بين 125–134 مايكرومتر مقارنة مع البويضات التي تراوحت أقطارها بين 95–105 مايكرومتر.

3– عمر المانحات (الواهبات) Age of Donors

أشار **Betteridge وزملاؤه (1989) و Duby وزملاؤه (1996)** إلى أهمية استخدام الحيوانات الصغيرة العمر كمانحات في برامج نقل الأجنة خاصة المستخدمة في عمليات التحسين الوراثي، وذلك لتقليل فترة الجيل على الرغم من انخفاض القدرة التطورية للأجنة المستحصل عليها من حيوانات غير بالغة مقارنة بالأجنة التي يتم الحصول عليها من حيوانات بالغة في الأبقار **(Kajihara وزملاؤه، 1991)**، والأغنام **(Crozet وزملاؤه، 1995)**.

بين **Kajihara وزملاؤه (1991)** أن البويضات التي جمعت من حيوانات غير بالغة قد تابعت انقسامها الاختزالي إلى مرحلة الـ M-II وبنسبة مقاربة للبويضات التي مصدرها الحيوانات البالغة، بالإضافة إلى قدرة تلك البويضات على التطور الجنيني بعد الإخصاب. إن تلك الملاحظات جعلت بالإمكان استعمال تلك الحيوانات كمانحات أجنة في برامج التربية، إن اتحاد برامج الاباضة الفائقة ونقل الأجنة Multiple ovulation and embryo transfer (MOET) يتماشى مع الإخصاب الخارجي للبويضات المأخوذة من حيوانات قبل البلوغ الجنسي، ما يزيد من التكهن بالمردود الوراثي أكثر من استخدام برامج اختبار النسل التقليدية **(Ptak وزملاؤه، 1999 a)**.

تعتمد القدرة التطورية للبويضات على عمر الأنثى المانحة والتي تكون اقل عند البكاكير بالمقارنة مع الأبقار تامة النمو**(Presicce وزملاؤه، 1997)**، أشار **Majerus وزملاؤه (1999)** إلى تماثل قدرة البويضات المستحصل عليها من البكاكير التي تراوحت أعمارها ما بين 7–11 شهراً مع القدرة التطورية للبويضات المستحصل عليها من أبقار مكتملة النضج، فيما أبدت البويضات المستحصل عليها من حويصلات بكيرات بعمر 3–4 اشهر اقل قدرة على التطور بالمقارنة مع الأبقار مكتملة النضج **(Palma وزملاؤه ،2001)**. توصل **Camargo وزملاؤه**

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

(**2002**) إلى أن البويضات المستحصل عليها من عجلات بعمر 4-5 اشهر أعطت معدلات انقسام مخبري في مرحلة الكيس الأصلي منخفضة مقارنة مع الأبقار البالغة في حين لم تكن هناك فروق معنوية بين البويضات المستحصل عليها من عجلات بعمر 9-11 شهراً مع الأبقار البالغة. و تعد البويضات المستخلصة من مبايض الحيوانات المذبوحة في المسالخ متغايرة Hetrogeneous لأنها تأتي من حويصلات مبيضية في مراحل نمو مختلفة، وقد أشار **Duby وزملاؤه** (**1996**) إلى أن الحويصلات المبيضية للحيوانات غير البالغة أمكن تحفيزها على النمو عند المعاملة مع هرمونات القند الخارجية، كذلك، لوحظ أن المعاملة بهرمون الـ FSH يحسن القدرة التطورية لبويضات الإناث غير البالغة (**Lu وزملاؤه، 1991**).

دلت نتائج **Mogas وزملاؤه** (**1997a,b**) على أن تعاقب وصول البويضات المجموعة في مرحلة الـ GV من العجلات غير البالغة و الفطائم خلال الانقسام الاختزالي إلى طور M-II مخبرياً يكون بنسبة مشابهة للبويضات المأخوذة من الحيوانات البالغة، وفي الوقت نفسه كانت البويضات بعد إخصابها قادرة على استكمال تطورها الجنيني اللاحق. وجد **الطائي** (**2003**) عند دراسة تأثير عمر المانحات في إنضاج وإخصاب بويضات الماعز مخبرياً عدم وجود فرق معنوي بين نسب إنضاج وإخصاب البويضات التي مصدرها إناث ماعز بالغة وغير بالغة ، كذلك لم تبين دراسته وجود تأثير لعمر الواهبات على انقسام البويضات المخصبة. بين **Wani وزملاؤه** (**2000**) عدم وجود فرق معنوي بالنسبة لعدد ونوعية البويضات المستخلصة والمستخدمة في برامج إنتاج الأجنة من النعاج التي تراوحت أعمارها بين 1و3 سنوات. أوضح **O'Brien وزملاؤه** (**1994**) زيادة حالات الإخصاب المتعدد وانخفاض في نسب الإخصاب الخارجي في بويضات النعاج الصغيرة العمر، كما أشار **Gonzalez De Bulnes وزملاؤه** (**2007**) إلى ارتفاع معدلات الأجنة والحمل عند النعاج بعمر سنة أكثر مما هي عليه في الفطائم. أوضح **Presicce وزملاؤه**(**1997**) بأن الأجنة التي وصلت إلى مرحلة الكيس الأصلي والناتجة من بويضات مأخوذة من نعاج بعمر سنة كانت سليمة من الناحية الشكلية ولم تختلف كثيراً عن نظيراتها الناتجة من النعاج المتقدمة في العمر، في حين كان البطء في التطور الجنيني لدى الأجنة الناتجة من بويضات النعاج التي بعمر اقل من سنة أكثر وضوحاً مقارنة مع نظيراتها المكتملة النمو (**Yones وزملاؤه، 2008**). وأوضح **Martino وزملاؤه** (**1994b**) أن عدد البويضات المستخلصة ونوعيتها في الماعز يتأثر تأثراً كبيراً فيما إذا كانت تلك الإناث بالغة أو غير بالغة. بينما لوحظ ارتفاع فعالية الإخصاب المخبري عند النعاج التي بعمر > 2 سنة (**Ledda وزملاؤه، 1997**). أما في الماعز فقد أشار **Izquierdo وزملاؤه** (**1999**) إلى عدم تمكن الأجنة التي مصدرها حيوانات غير بالغة جنسياً من الوصول إلى مرحلة الكيس الأصلي، وقد

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

أعطت تلك الملاحظة الدليل على عدم اكتمال الإنضاج، أو حصول نقص في سيتوبلاسم البويضات من الحيوانات غير البالغة والذي نتج عنه انخفاض في القدرة على دعم ومساندة تطور الجنين مخبرياً (**Earl وزملاؤه، 1998**)، بينما تزداد قدرة بويضات الفئران والهامستر على الإنضاج المخبري مع زيادة العمر قبل البلوغ ومع زيادة نمو الحويصلات وقطر البويضة (**Szybek، 1972**).

4- الأوساط الزرعية Culture media

يعتمد نجاح عملية إنضاج وإخصاب البويضات مخبرياً على نوع الوسط الزرعي الذي يساعد على تحفيز العمليات الحيوية داخل البويضة (**Mermillod وزملاؤه، 2006**). تراوح تركيب الأوساط الزرعية بين استعمال محاليل بسيطة (**Trounson وCaro، 1984**) إلى أوساط أكثر تعقيدا محتوية على البروتينات، والأحماض الامينية، والكاربوهيدرات، وعوامل نمو (**Sokoloski وWalf، 1989**).

أشار **Voelkel وزملاؤه (1992)** إلى أهمية استخدام عدة أوساط زرعية للإنضاج المخبري منها MEME (Menimum Essential Medium) وWaymouth و Ham-F12 و Ham-F10 و مع ذلك فلا زال الوسط الزرعي TCM199 هو الأكثر استخداما وانتشارا لاحتوائه على البيكربونات المعدلة، والمعادن، ومصادر الطاقة كالغلوكوز، والغلوتامين والفيتامينات، والأحماض الامينية، كما يحتوي هذا الوسط على مكونات ذات أوزان جزيئية مرتفعة غنية بالهرمونات وعوامل النمو (FCS، ومصل دماء الإناث الشبقة، والسائل الحويصلي).

توصل **السامرائي (2002)** إلى نسبة إنضاج قدرها36.6 % باستخدام الوسط الزرعي TCM-199 في الأبقار، وتمكن **الجلبي (2003)** من جعل بويضات الفئران تبلغ الإنضاج المخبري بنسبة 66.5 % باستخدام نفس الوسط.

سابعاً-التجميد Cryopreservation

تعد عملية تجميد الأجنة تطبيقاً روتينياً هاماً في التناسل والانتخاب في الماشية، والماعز، والأغنام ولقد واجهت عملية تجميد الأجنة لدى المجترات الصغيرة العديد من المشاكل من حيث تأثيرها على نوعية الأجنة الناتجة ومواصفاتها (**Polge وزملاؤه، 1949**).

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

استطاع **Smith (1952؛1953)** أن يحفظ أجنة الأرانب بنجاح في وسط يحوي الغليسيرول الذي يستخدم أيضا في تجميد السائل المنوي (**Polge وزملاؤه، 1949**). في حين تمكن **Wittingham وزملاؤه (1972)** و **Wilmut (1972)** من حفظ أجنة الفئران في وسط يحوي الـ DMSO (DiMethyl SulphOxide) ضمن محاليل تميزت بوزن جزيئي مشابه لما هو عليه في الغليسيرول و تبين من نتائجهما أن تجميد الأجنة ضمن معدلات تجميد بطيئة يعطي نتائج معنوية بعد الإذابة، كما تم التوصل إلى نتائج مشابهة في الأبحاث التي جرت على أجنة المجترات (**Bank و Maurer، 1974 ؛ Tsunoda و Sugie، 1977**) في الأرانب، و (**Bilton وMoore، 1976**) في الماعز. كما حدد **Wilmot وRowson (1973)** بعد ذلك إجراءات تطبيق تجميد الأجنة عند الأبقار و**Willadsen وزملاؤه (1974)** عند الأغنام.

أوضح **Suzuki وزملاؤه (1990)** أن حفظ الأجنة في أوساط تحوي البروبانيول (propandiol) أعطى تأثيرا فعالا عند حفظ أجنة الأبقار، كذلك استُخدم السكروز على نطاق واسع في تقانة نقل الأجنة وزراعتها (**Leibo، 1983 a,b**). وسُجلت أول ولادة ناجحة لعجل تم زراعته في الرحم بعد التجميد (**Wilmut وRowson، 1973**) واعتبرت تلك الحادثة الانطلاقة الأولى لتطوير طرق تجميد الأجنة المنتجة داخل الجسم، بينما سجلّ **Willadsen وزملاؤه (1976)** أول ولادة ناجحة عند الأغنام، و سجل **Bilton وMoore (1976)** أول ولادة ناجحة عند الماعز. ارتفعت نسب الولادات عند العديد من الدراسات الناجحة المتعلقة بتجميد أجنة الأغنام والماعز بدءا من العام 1976 نتج عنها معدل ولادات مرتفع عند زراعة الأجنة المذابة في مرحلة التويتة والكيس الأصلي(**Willadsen وزملاؤه ،1976**). أشار **Gajda وزملاؤه (1989)** إلى أول نجاح لعملية تجميد أجنة الأغنام بطريقة التجميد السريع بالتزجيج Vitrification بلغ معدل البقاء 60%، وفي دراسة أخرى لـ **Ptak وزملاؤه (1999a)** وجدت فروق غير معنوية في معدلات الحمل عند زراعة أجنة الأغنام سواء غير المجمدة أو المجمدة بطريقة التزجيج (47 مقابل 42%)، في حين لوحظ فرق معنوي في معدلات الولادة بين المجموعتين (41 مقابل 23%).

على الرغم من قلة الدراسات التي أجريت حول تجميد أجنة الماعز أوضح **Li وزملاؤه (1990)** أن معدلات الحمل كانت تقريبا متساوية عند زراعة الأجنة في مرحلة الكيس الأصلي سواء كانت مجمدة أو غير مجمدة (الطازجة)، كما أوضحت الدراسات اللاحقة وجود فرق معنوي (p< 0.05) عند تجميد وإذابة الأجنة المنتجة مخبرياً وداخل الجسم (60 مقابل 45%) (**Tradi وزملاؤه ،1999**). أكدت دراسات **Dobrinsky (2002)** و **Fuller وPaynter (2007)** أن أجنة المجترات الصغيرة سواء المنتجة مخبرياً أو داخل الجسم أبدت معدلات بقاء متشابهة وتطور

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

جنيني متماثل بعد تجميدها ونقلها. أوضح **Ruffing وزملاؤه (1993)** أن أكثر طريقتين شائعتين تستخدمان في تجميد أجنة الحيوانات المختلفة هما طريقة التجميد السريع بالتزجيج والتجميد البطيء Slow freezing. وقد كانت طريقة التجميد البطيء هي أولى الطرق التقليدية المتبعة في تجميد الأجنة إذ يتم فيها تحديد معدلات تجميد مهمتها السماح للماء الداخلي والخارجي بالتبادل عبر خلايا الأجنة دون حدوث تغيرات في الضغط التناضحي تؤثر سلباً على شكل الأجنة وحيويتها، وقد استخدمت طريقة التجمد البطيء بنجاح مقبول على أجنة مختلف الحيوانات.

أفادت العديد من الدراسات أن طرق التجميد البطيء لم تعط نتائج مرضية خاصة أن خلايا أجنة بعض الأنواع الحيوانية (الخنازير) تكون حساسة للبلورات الثلجية (chilling sensitivity) بسبب ازدياد نفاية الغشاء السيتوبلاسمي في خلايا تلك الأجنة خلال عملية التجميد، كما أن محتوى الخلايا من الليبيدات واستقلابها يؤثر سلباً في معدلات البقاء (**Nagashima وزملاؤه ،1994؛McEvoy وزملاؤه ،2000**). بين **Jaroslava وزملاؤه (2010)** أن عملية التجميد السريع المطبقة على الأجنة حتى مرحلة الكيس الأصلي لها عدة فوائد منها منع تشكل البللورات الثلجية الخطرة سواء الداخلية منها أو الخارجية، والتقليل من سمية واقيات التجميد وتأثيرات سائل التجميد، وتقليل صدمة الضغط الاسموزي والحساسية تجاه البرودة، كما أن عملية التجميد السريع تمتاز عن تقنية التجميد البطيء بكونها أسرع من سابقتها إذ أن ارتفاع تراكيز موانع التجمد يؤدي إلى قصر الفترة التي تتعرض فيها الأجنة إلى تلك الموانع، كما أن تغطيس الأجنة مباشر في الآزوت السائل يختزل معدلات التجميد تماما (rate freezing) ليتحول إلى معدل تجميد واحد عالي السرعة (ultra rapid)، كما تمتاز هذه الطريقة بقلة تعرض الأجنة إلى التأثير القري الضار الذي يتسم بتشكيل البللورات الثلجية الضارة والخطيرة على خلايا الأجنة علاوة على قلة التجهيزات المطلوبة لإتمامها في المخبر.

أوضح **Ashmore (1997)** أن طريقة التجميد السريع لا تشكل خطراً كبيراً على خلايا الأجنة المجمدة لأنها تقوم بتجميد السائل الخلوي الداخلي والخارجي وتصلبه بطريقة تمنع تشكيل بللورات ثلجية مخربة لأنسجة الجنين أو البويضات أو النطاف على عكس ما هو عليه في التجميد البطيء (slow cooling) والتي تترافق بتشكيل بللورات ثلجية ذات اثر ضار على خلايا الأجنة.

تعتمد طريقة التجميد السريع أساساً على استخدام التراكيز العالية من موانع التجمد من جهة وعلى معدلات تجميد سريعة جداً من جهة أخرى، وهي طريقة بسيطة جداً وذات كلفة منخفضة، كما أنها أعطت نتائج عالية المعنوية في تجميد أجنة العديد من الأنواع الحيوانية، وأظهرت تفوقاً

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

واضحاً على طرق التجمد البطيئة بالنسبة للأنواع الحيوانية التي تمتاز أجنتها بحساسيتها للبللورات الثلجية، ولقد تم التوصل إلى معدلات بقاء مرتفعة (79%) لأجنة الأبقار المنتجة مخبرياً في مرحلة الكيس الأصلي والمزججة عند إذابتها (**Vajta وزملاؤه، 1996**) .

أشار **O'Kearney-Flynn وزملاؤه (1998)** إلى وجود فروق معنوية في معدلات البقاء بين الأجنة المنتجة داخل الجسم والأجنة المنتجة مخبرياً بالنسبة لطرق التجمد إذ أبدت الأجنة المنتجة داخل الجسم معدلات بقاء مرتفعة مقارنة مع الأجنة المنتجة مخبرياً كون الأخيرة تكون حساسة للبرودة والبللورات الثلجية نظراً لارتفاع محتواها من الليبيدات. وجد أن تقليل محتوى الأجنة من الليبيدات وذلك بإزالتها بطرقة التثفيل يزيد من قدرة الأجنة على مقاومة البرودة والبللورات الثلجية (**Esaki وزملاؤه ،2004**).

أشار **الدرويش (2009)** إلى وجود كميات قليلة من الفوسفوليبيدات في أجنة الأبقار المنتجة مخبرياً والتي تكون مترافقة بنسب عالية من التريغليسيريدات (الشحوم الثلاثية)، الأمر الذي يعطي مقاومة ضعيفة للأجنة عند حفظها بطريقة التجميد. وعلى هذا الأساس تم وضع نظريتين توضحان آلية اختراق موانع التجمد لخلايا الأجنة أثناء عملية الحفظ في الآزوت السائل، حيث تفيد النظرية الأولى بأن درجة الإشباع للخلايا الجنينية بالأحماض الدهنية غير المشبعة يمكن أن تلعب دوراً مهماً في عملية اختراق مانع التجمد للجنين، بينما تفيد النظرية الثانية بأن التخزين و التراكم المفرط من الشحوم الثلاثية في الجنين يمكن أن يؤثر سلباً على عملية اختراق المادة الحافظة للخلايا الجنينية. إن تقليل نسب الليبيدات في السيتوبلاسم عن طريق إضافة العامل PES(Phenazine ethosulphate) يحسن من قدرة أجنة الأبقار على تحمل صدمة التجميد (**Seidel ،2006**) كما وجد **Gajda وزملاؤه (2008a)** فرق معنوي في نسب الليبيدات في سيتوبلاسم خلايا الأجنة إذ كانت تلك النسب منخفضة عند استخدام PES، ما أدى إلى ارتفاع معدلات بقاء الأجنة (**Gajda وزملاؤه ،2008 b**). أوضح **Abe وHoshi (2003)** أن أجنة الأبقار المنتجة مخبرياً بوجود FCS في الأوساط الزرعية أبدت نوعية منخفضة، وتأخر في التطور الجنيني اللاحق، وحساسية للتجميد نتيجة للانحرافات الناتجة في الكميات النسبية المنتجة من نسخ الـRNA في السيتوبلاسم (**Rizos وزملاؤه ،2003**).

أوضح **Pugh وزملاؤه (1998)** أن أجنة الأبقار المنتجة مخبرياً في أوساط زرعية محتوية على FCS (Fetal Calf Serum) أبدت معدلات بقاء منخفضة عند إذابتها بعد التجميد ويرجع الباحثون تلك النتائج السلبية في معدلات بقاء الأجنة أثناء التجمد إلى ارتفاع محتوى الخلايا الجنينية من الليبيدات المتراكمة عند زراعة الأجنة في أوساط تحتوي على FCS الأمر الذي

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

يستوجب زراعة الأجنة في أوساط زرعية تحتوي على جزيئات ذات وزن جزيئي مرتفع كالـPVA والـ phicoll (Polyvinylalcohol) (**Suzuki وYoshioka، 2006**)، أو استخدام حامض الهيالورون (**Palasz وزملاؤه، 2008**). وجد **فهيم (2007)** في دراسة على أجنة الأرانب المنتجة داخل الجسم في مرحلة 8 خلية فرق معنوي في سمك طبقه النطاق الشفاف و القطر الكلي للجنين مع استخدام التجميد السريع مقارنه بالبطيء، ومع الوسط الزرعي HAM f-10 مقارنه مع الوسط الزرعي TCM -199 .

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

مبررات البحث والأهداف

نظراً لأن العديد من نعاج العواس المتميزة تستبعد أو تذبح بعد انقضاء فترتها الإنتاجية التي لا تتجاوز أكثر من خمسة مواسم وهي لا تزال تحمل آلاف البويضات في مبايضها، وبما أن هذه البويضات تشكل مادة وراثية كامنة ورخيصة يمكن الاستفادة منها وإخصابها خارج الرحم للحصول على أجنة يمكن نقلها إلى نعاج مستقبلة الأمر الذي يساعد في الاستمرار في نشر العوامل الوراثية لمثل هذه النعاج المتميزة في المستقبل .

ولهذا كان الإلمام بظروف جمع البويضات وتنميتها وإخصابها خارج الرحم وبطرق حفظ الأجنة يعد من الخطوات الهامة والأساسية لنجاح استخدام هذه التقانة والاستفادة منها في التطبيقات العملية على الحيوانات الزراعية المنتشرة في سورية كأغنام العواس، والأبقار الشامية، والماعز الشامي وذلك بهدف حفظ الموارد الوراثية الحيوانية لهذه السلالات في بنوك وراثية وطنية

وتعد تقانة الإنضاج والإخصاب خارج الرحم (IVM-IVF) من الطرق الهامة والأساسية التي يمكن أن تساعد في زيادة أعداد النعاج المتفوقة في قطعان النوى في محطات البحوث و زيادة أعداد كباش التلقيح الممتازة وتسرع انتخابها للوصول إلى قطعان عالية الإنتاج من اللحم والحليب والصوف في قطعان الأغنام لدى المربين و التحسين الوراثي التدريجي الشامل لهذه القطعان، لذلك هدفت هذه الدراسة إلى:

1- تحديد إمكانية إنضاج بويضات النعاج وإخصابها وتنميتها مخبرياً.
2- دراسة مراحل تطور النوى خلال الإنضاج المخبري لبويضات نعاج العواس.
3- تأثير عمر النعاج المانحة وفصل السنة وتداخلهما في إنضاج وإخصاب بويضات النعاج .
4- تأثير حجم الحويصلة المبيضية وقطر البويضة في إنضاج وإخصاب بويضات النعاج .
5- تأثير مستوى هرمون الـ FSH في إنضاج وإخصاب بويضات النعاج وانقسامها مخبرياً
6- تأثير مستوى السيستامين Cysteamine في إنضاج وإخصاب بويضات النعاج وانقسامها مخبرياً.
7- تأثير موانع التجمد واختيار أفضلها في معدل بقاء أجنة نعاج العواس المنتجة مخبرياً والمجمدة بطريقة التزجيج.

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

الفصل الثاني

2– مواد وطرائق البحث

Materials and Methods

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

نُفذَّت الدراسة اعتباراً من 2008/3/15 ولغاية 2010/10/30 في مخبر التقانات الحيوية بقسم الانتاج الحيواني في كلية الزراعة – جامعة حلب

1- حيوانات التجربة Donors

اعتَمدت الدراسة على نعاج العواس المذبوحة في المذبح الفني لمدينة حلب وهي بأعمار مختلفة تراوحت بين 8 أشهر و4 سنوات كمصدر للحصول على مبايض النعاج على مدار العام طوال فترة الدراسة لغرض اجراء التجارب الخاصه بالدراسة .

2- جمع المبايض Ovaries Collection

جُمعت المبايض من النعاج بصورة دورية كل 1-2 أسبوع وعلى مدار العام وذلك بعد 10-15 دقيقة من الذبح في حافظة بلاستيكية محكمة الإغلاق تحوي بداخلها محلول فيزيولوجي NaCl بتركيز 0.9% (الملحق1) مضافاً إليه مضادات حيوية (75 مغ /ل بنسلين و 75مغ/ل ستربتومايسين) بدرجة حرارة 30-37ْم حيث وضعت المبايض المحتوية على حويصلات مبيضية بأطوار مختلفة من النمو، ونُقلت إلى المخبر خلال مدة لا تتجاوز 1 ساعة بعد الجمع وقد استبعدت كل المبايض غير السليمة والشاذة. غُسلت المبايض المجموعة بعد إخراجها من الحافظة في المخبر بماء دافئ بدرجة حرارة 37ْم عدة مرات لإزالة الجلطات الدموية والأوساخ العالقة عليها، ثم وضعت في ماء دافئ في البيشر على صفيحة تسخين حرارتها39 مئوية تمهيداً لجمع البويضات منها (الصور 1، و2، و3).

3- جمع البويضات Oocytes Collection

طُبقت طريقة التشريط (التشطيب) لجمع البويضات حيث شُرِّط سطح كل مبيض بشكل كثيف وبعدة اتجاهات وعلى كامل أسطح الحويصلات المبيضية باستعمال مشرط حاد Blade لضمان الحصول على اكبر عدد من البويضات ثم غُسلت المبايض بمحلول الـ PBS (محلول داريء الفوسفات الملحي- دلبيكو (Dulbecos – phosphate buffer saline (DPBs) الدافئ عدة مرات أثناء التشطيب واستقبلت البويضات الناتجة مع السائل الحويصلي في طبق بتري يحتوي بدوره على محلول PBS بدرجة حموضة 7.3pH، مضافاً إليه الـ BSA مع المضادات الحيوية (75 مغ /ل بنسلين و 75مغ/ل ستربتومايسين) والهيبارين لمنع حدوث الجلطات في السائل الحويصلي، تم مداولة البويضات في غرفة عمل معقمة Laminar flo (– CLEAN BENCH)، حيث عُزل معقد البويضة الركامية (COCs)، جُمعت البويضات بواسطة

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

الميكروبيبيت Micropipette والـ stripper (U.S.A) بالاستعانة بالمكبرة (NIKON-Japan) والمجهر المعكوس(Micros-Austria) (الصورة 4)، وعُزلت البويضات الصالحة للإنضاج والحاوية على أكثر من طبقتين من الخلايا الركامية مع تحبب سيتوبلاسمي متساو (Granulated cytoplasm) (الصور 5، و6، و7).

4-تجهيز البويضات للإنضاج المخبري Preparing Oocytes for IVM:

نُقلت البويضات بواسطة الميكروبيبيت لطبق بتري رباعي الحجرات من اجل فحص البويضات وانتقاء السليمة منها و استبعاد كافة الأشكال الشاذة لها كالتي أظهرت تشوهات سيتوبلاسمية مثل وجود فقاعات داخل السيتوبلاسم (الصورة 8) والتي حصل لها انكسار في النطاق الشفاف (Z.P) (الصورة 9) و العارية من الخلايا الركامية (الصورة 10)، و ذات التحلل السيتوبلاسمي (الصورة 11) و ذات الانحسار السيتوبلاسمي (الصورة 12) ، والتي حدث لها فقدان للسيتوبلاسم (الصورة 13).

5- إنضاج البويضات مخبرياً In Vitro maturation of Oocytes

نُقلت البويضات (معقد البويضة الركامية (COCs)) إلى طبق بتري رباعي آخر والحاوي على وسط الإنضاج TCM-199(M-5017،Sigma) والموضوع قبل 24 ساعة من الاستعمال يحتوي في كل حجرة منه على 0.5 مل من الوسط الزرعي TCM-199 مع الإضافات الخاصة بكل تجربة بحيث تراوح الضغط الاسموزي للوسط الزرعي ما بين 270-300 ميلي اوزمول ، وضعت 10-15 بويضة في كل حجرة، ثم غُطيت بزيت البارافين، ونُقلت إلى حاضنة ضمن الشروط CO_2 بتركيز 5%، ودرجة حرارة 38.5°م، ورطوبة نسبية عالية 95% لمدة أقصاها 27 ساعة وفقاً لـ **Crozet وزملاؤه (2000)**. بعد انتهاء مدة الحضن أخرجت البويضات وفُحصت تحت المجهر المعكوس، عُزلت البويضات الناضجة والتي تميزت بتمدد الخلايا الركامية وظهور الجسم القطبي الأول (الصور14، و15، و16) ، نُقلت البويضات الناضجة إلى طبق بتري آخر وغُسلت وأُزيلت طبقة الخلايا الركامية المحيطة بها باستعمال الميكروبيبيت و سُحبت البويضات وأُعيدت عدة مرات بالـ Stripper للتخلص من الطبقات المحيطة بها لتكون جاهزة للإخصاب. واستُخدمت طرائق مختلفة تتناسب ونوع العوامل المدروسة في الإنضاج المخبري وفق مايلي:

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

5-1 اعمار النعاج المانحة Ewes Age:

جُمعت 1363 بويضة من مبايض النعاج المذبوحة ووزعت حسب اعمارها المقدرة بطريقة التسنين الى ثلاث فئات : 1 - المجموعة A (< 1سنة)

2- المجموعة B (1-2 سنة)

3- المجموعة C (> 2 سنة)

اعتُمد في هذه التجربة الوسط الزرعي TCM -199 (الملحق 2) للانضاج ومتابعة تطور البويضات المخصبة ، والوسط الزرعي TALP لاكتساب النطاف ظاهرة الاستعداد و استكمال نضجها النهائي واخصاب البويضات (الملحق4).

5-2 فصل السنة Season:

جُمعت بويضات نعاج العواس (1363 بويضة) وقُسمت الى أربع مجموعات حسب تاريخ جمع المبايض بما يتناسب وفصول السنة الاربعة:

1- مجموعة الشتاء (ك1 ،ك2 ، شباط)
2- مجموعة الربيع (اذار ، نيسان ، أيار)
3- مجموعة الصيف (حزيران ، تموز ، أب)
4- مجموعة الخريف (ايلول ، ت1 ،ت2)

اعتُمد في هذه التجربة الوسط الزرعي 199- TCM (الملحق 2) للانضاج ومتابعة تطور البويضات المخصبة ، والوسط الزرعي TALP لاكتساب النطاف ظاهرة الاستعداد و استكمال نضجها النهائي واخصاب البويضات (الملحق4).

5-3 اقطار الحويصلات المبيضية Follicular Size:

جُمعت 418 بويضة من حويصلات مبيضية تختلف بأحجامها ووزعت حسب اقطار الحويصلات المبيضية التي جُمعت منها الى أربع مجموعات (**DeSmedt وزملاؤه، 1994)** تضمنت :

1- المجموعة A بويضات الحويصلات التي قطرها اقل من 1 مم
2- المجموعة B بويضات الحويصلات التي اقطارها بين 1 واقل من 2 مم
3- المجموعة C بويضات الحويصلات التي اقطارها بين 2 واقل من 3 مم
4- المجموعة D الحاوية على بويضات حويصلات اقطارها ≤3مم

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

قيست أقطار الحويصلات المبيضية باستعمال مسطرة مدرجة بمم ، شُرِّطت الحويصلات المبيضية حسب اقطارها واستقبلت البويضات الخاصة بكل مجموعة في طبق بتري خاص، كمااعتُمد في هذه التجربة الوسط الزرعي TCM-199 (الملحق 2) للانضاج ومتابعة تطور البويضات المخصبة المستخلصة من تلك الحويصلات ، والوسط الزرعي TALP لاكتساب النطاف ظاهرة الاستعداد و استكمال نضجها النهائي واخصاب البويضات (الملحق4).

4-5 أقطار البويضات Oocytes Diameter:

غُسلت البويضات 2 – 3 مرات، وعُريت من الخلايا الركامية جزئياً بشكل آلي (عملية سحب وإعادة) باستعمال ميكروبيبيت ، وقيست أقطار البويضات باستعمال (Micrometer) مثبت في العدسة العينية للمجهر المعكوس أو المكبرة ، قيست أقطار البويضات وصنفت إلى أربع مجموعات وفقاً لـ **Fair وزملاؤه (1995)** :

1- المجموعة A البويضات التي أقطارها اقل من 100 مايكرومتر
2- المجموعة B البويضات التي تراوحت أقطارها بين 100 واقل من 110 مايكرومتر
3- المجموعة C البويضات التي تراوحت أقطارها بين 110 واقل من 120 مايكرومتر
4- المجموعة D البويضات التي تراوحت أقطارها ≤120 مايكرومتر.

نُقلت البويضات إلى طبق بتري مقسم إلى مربعات وخُصص لكل بويضة مربع مرقم واعتُمد الوسط الزرعي 199- TCM (الملحق 2) الذي وضع على شكل قطرات في المربعات الموجودة على الطبق للإنضاج ومتابعة تطور البويضات المخصبة ، والوسط الزرعي TALP لاكتساب النطاف ظاهرة الاستعداد و استكمال نضجها النهائي وإخصاب البويضات (الملحق4).

5-5 اضافة مستويات هرمون FSH FSH levels

اعتُمدت خمسة تراكيز من هرمون FSH (Gonal-F: Intervet international B.V. – Boxmeer –Holand –) لانضاج بويضات نعاج العواس (1332 بويضة) من حويصلات اقطارها ≤ 2 مم في الوسط الزرعي TCM-199 وفق 6 مجموعات مايلي (الملحق3):

1- المجموعة A (شاهد)
2- المجموعة B (0.1 مايكروغرام/مل)
3- المجموعة C (1 مايكروغرام/مل)
4- المجموعة D (5 مايكروغرام/مل)

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

5- المجموعة E (50 مايكروغرام/مل)

6- المجموعة F (75 مايكروغرام/مل)

اعتُمد في هذه التجربة الوسط الزرعي TALP لاكتساب النطاف ظاهرة الاستعداد و استكمال نضجها النهائي وإخصاب البويضات (الملحق4). في حين اعتمد الوسط الزرعي TCM-199 لمتابعة انقسام البويضات وتطورها (الملحق2).

5-6 اضافة مستويات السيستامين Cysteamine levels

أُضيف الى الوسط الزرعي TCM-199 ثلاثة تراكيز من السيستامين (Sigma®M9768) لا نضاج بويضات نعاج العواس (942 بويضة مع الاضافات المخصصة للتجربة (الملحق3)) من حويصلات اقطارها ≤ 2 مم، وبناءً على تراكيز السيستامين وزعت البويضات الى اربع مجموعات وفق مايلي:

1- المجموعة A (شاهد)

2- المجموعة B (100 مايكرومولر)

3- المجموعة C (200 مايكرومولر)

4- المجموعة D (400 مايكرومولر)

اعتُمد في هذه التجربة الوسط الزرعي TALP لاكتساب النطاف ظاهرة الاستعداد و استكمال نضجها النهائي وإخصاب البويضات (الملحق4)، في حين اعتُمد الوسط الزرعي TCM-199 لمتابعة انقسام البويضات وتطورها (الملحق2).

6- تقدير مراحل تطور النوى: Evaluating Stages of Nuclear Development

تم إنضاج بويضات نعاج عواس سليمة من الناحية الشكلية ومحاطة بأكثر من طبقتين من الخلايا الركامية، أُزيلت طبقات الخلايا الركامية من تلك البويضات باستعمال إنزيم الهيالورونيداز بكمية 20 وحدة دولية / مل، ثم عُرِّضت البويضات لعملية رج بواسطة جهاز الفورتكس vortex قُسِّمت البويضات إلى ثمان مجموعات وفقاً لفترات الإنضاج حسب طريقة **Beker وزملاؤه (2000)** بعد مرور 0، و3، و6، و9، و12، و24، و27 ساعة، عُزلت 212 بويضة من تلك البويضات لفحص مراحل تطور النوى، ثُبتت كل مجموعة من البويضات المحضنة في الفواصل الزمنية السابقة باستعمال حمض الخل الثلجي (Glatial Acetic Acid) مع الايثانول (Ethanol) بنسبة 1 : 3، وتُركت البويضات لمدة 24 ساعة تحت درجة 4ْم ثم ،سُحبت إلى شرائح زجاجية، ومن ثم صُبغت بصبغة الاورسين (Aceto orcine) بتركيز 1% لمدة نصف

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

ساعة. غُسلت الشرائح ثلاث مرات بتراكيز مرتفعة من الايثانول لإزالة الصبغة الزائدة كالتالي :5 ثانية في 70% ايثانول و 1 د و 3 د في الايثانول 100% حسب **Rezk (2005)**. فُحصت مجاميع البويضات باستعمال مجهر ضوئي بتكبير X1000 خلال الفترات الزمنية السابقة أثناء الإنضاج، مع استعمال الوسط الزرعي TCM-199 في انضاج البويضات (الملحق2)، حُددت مظاهر البويضات التي اجتازت مرحلة الـ ProM–I ببداية ظهور الصبغيات على شكل خيوط غير منتظمة، بينما حُددت البويضات في مرحلة M-1 بتكاثف الصبغيات واصطفافها على المغزل، كما حُددت البويضات التي اجتازت مرحلة الـ M-II اعتماداً على وجود الجسم القطبي الأول والتكاثف الشديد للصبغيات.

7- تقييم السائل المنوي واستعداد النطاف مخبرياً Sperms Evaluation and Capacitation

استُخدمت قشات السائل المنوي المجمد (0.5 مل) من الكباش العواس المرباة في محطة ازرع التابعة للمركز العربي (أكساد) . أُجريت عملية استعداد النطاف واستكمال إنضاجها حسب طريقة **DeSmedt وزملاؤه (1992)** حيث خُفف السائل المنوي المأخوذ من كامل القشة (0.50 مل) مع 8 مل من وسط TALP المعد لغسيل النطاف (ملحق 4) بعد تثفيله بجهاز الطرد المركزي بمعدل 900 دورة / دقيقة ولمدة 10 دقائق وبدرجة حرارة 37°م ، أُخذت النطاف المتجمعة في قعر الأنبوب بشكل قرص، مع إهمال بقية السائل وأُضيف لها مرة أخرى 8 مل من نفس الوسط وأُعيد تثفيل السائل بنفس المعدل السابق ولمدة 10 دقائق، ثم أُخذت النطاف المتجمعة و أُضيف2 مل من وسط الإنضاج (ملحق4) وإضافة 10 مايكرو غرام /مل هيبارين، ثم تُركت النطاف لتسبح للأعلى (Swim-up) لمدة 1.5 ساعة في حمام مائي بدرجة حرارة 38.5°م، ثم سُحب الجزء العلوي 1 مل الحاوي على النطاف الطافية ذات الحيوية العالية وقدرت حركة النطاف باستعمال المجهر الضوئي مع تقدير تركيز النطاف باستخدام عداد نيوبار، خُفف السائل الأخير بإضافة وسط الإخصاب (ملحق4) ليصبح تركيز النطاف 1.5×10^6 نطفة / مل ثم نُقلت إلى الحاضنة وتُركت لمدة 4 – 5 ساعات بدرجة 38.5°م لتكون جاهزة لإخصاب البويضات.

8-إخصاب البويضات مخبرياً In Vitro Fertilization of Oocytes

وضعت 5–10 من البويضات العارية الناضجة لكل 1 مل من وسط الإخصاب الحاوي على النطاف في طبق بتري (4-wall plate)، ثم نُقلت إلى حاضنة CO_2 بتركيز 5% وبدرجة حرارة 38.5°م وتُركت لمدة 17 –18 ساعة بعدها غسلت البويضات في محلول الـ PBS للتخلص

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

من بقايا النطاف المتعلقة بالبويضة (**Martino وزملاؤه، 1994 b**)، وفُحصت تحت المجهر المعكوس Inverted microscope لملاحظة إخصاب البويضات من خلال ظهور الجسم القطبي الثاني (Second polar body) و البدأتان النوويتان الذكرية والأنثوية (الصورة 17) .

9- تطور البويضات المخصبة مخبرياً In Vitro Culture

نُقلت البويضات التي ظهرت عليها علامات الإخصاب إلى الوسط الزرعي 199- TCM المخصص للانقسامات (ملحق 2) وحُضِّنت حتى اليوم التاسع، استُخرجت أطباق بتري الحاوية على البويضات المخصبة بفترات متعددة لملاحظة الانقسام الخلوي والنمو بدءاً من مرحلة 2 خلية وحتى مرحلة الكيس الأصلي الناتش (الفاقس)(الصور 18، و19، و20، و21).

10- تجميد الأجنة Cryopreservation :

عُزلت 105 بويضات نعاج عواس مخصبة ووصلت إلى مراحل مختلفة من التطور الجنيني ووضعت في ثلاث أوساط يحوي أولاها على DMSO (DiMethylSulphOxide) كمانع تجميد ويحتوي الثاني على EG (Ethylene Glycol) كمانع تجميد آخر في حين احتوى الوسط الثالث على مزيج من DMSO وEG تضمن كل وسط قسمين الأول محلول الموازنة (ES) Equilibration Solution والثاني محلول التجميدVitrification Solution (VS) (الجدول1).

أُضيف كل من محلول الموازنة ومحلول التجميد إلى الوسط الزرعي 199- TCM مع إضافة 20% مصل بينما أضيف 0.5 M سكروز لمحلول الموازنة فقط ES بحيث يكون حجم كل محلول 10 مل.

وزِّعت الاجنة حسب مراحلها المختلفة (2-16) خلية، التويتة، والكيس الاصلي حسب اوساط التجميد الثلاثة (الجدول2).

عُوملت الأجنة الخاضعة لعملية التجميد بالتزجيج في الأوساط الثلاثة كالتالي:

1- مرحلة التعرض لمحلول الموازنة ES (Equilibration Solution): وضعت الأجنة في محلول الموازنة ES لمدة 8 دقيقة في غرفة معتدلة درجة الحرارة حتى تعود الأجنة إلى حجمها الطبيعي (re-expansion) نظراً للتقلص الذي أصابها لحظة وضعها في محلول الموازنة.

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

2- مرحلة التعرض لمحلول التجميد VS (Vitrification Solution): نُقلت الأجنة من محلول ES ووضعت في محلول التجميد VS لمدة دقيقة في غرفة معتدلة درجة الحرارة وخلال هذه المدة وضع 6 أجنة في القشة الواحدة (0.25) مم وأغلِقت جيداً بجهاز خاص (الصورة27) وحسب الشكل1 قبل انتهاء المدة المحددة (1 دقيقة).

3- مرحلة التجميد Vitrification: غُطِّست الأجنة المحمولة في القشات بعد انتهاء الدقيقة (VS)مباشرة (plung) في الآزوت السائل.

الجدول 1. تراكيز موانع التجمد والمصل في محلول الموازنة ومحلول التجميد في الاوساط المستخدمة في عملية التزجيج لأجنة اغنام العواس

الوسط A (DMSO)		الوسط B (EG)		الوسط C (DMSO+EG)	
محلول الموازنة (ES)	محلول التجمد (VS)	محلول الموازنة (ES)	محلول التجمد (VS)	محلول الموازنة (ES)	محلول التجمد (VS)
1.5مل	3 مل	1.5 مل	3مل	750 مايكروليتر (DMSO) + 750 مايكروليتر (EG)	1.5 مل (DMSO) + 1.5مل (EG)

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

الجدول2. توزيع الأجنة حسب مراحل تطورها في أوساط التجميد

	أوساط التجميد	الأجنة	مراحل تطور الأجنة		
			(2−16) خلية	توتة	كيس اصلي
		عدد	عدد	عدد	عدد
A	DMSO	34	13	9	12
B	EG	33	11	10	12
C	DMSO+EG	38	14	10	14
	الكلي	105	38	29	38

A	B	D	C	D	B	E

الشكل 1. حفظ الأجنة في قشة قياسية TS(Traditional Straws) حيث A: مكان الكتابة والترقيم ،B: محلول تجميد D،VS: فراغ هوائي (فقاعة) ،C:الأجنة المجمدة مع محلول التجميد،E: مكان إغلاق القشة.

11− إذابة الأجنة والزرع Embryos Thawing and Culture:

تُركت الأجنة في الآزوت السائل لمدة ثلاثة أيام (72 ساعة) ثم أُذيبت بوضعها في وسطين (مرحلتين)A وB (الجدول 3):

الجدول 3. تركيز السكروز والمصل البقري في وسطي إذابة الأجنة المجمدة

المادة	الوسط A (المرحلة الأولى)	الوسط B (المرحلة الثانية)
سكروز	1 M(3.42غ)	0.5 M(1.71غ)
مصل	%20	%20

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

أُضيف كل من الوسطين A و B إلى الوسط الزرعي TCM-199 وأُكمل حجم كل محلول إلى 10 مل، أُذيبت الأجنة وفق مرحلتين حسب**Moussa وزملاؤه (2005)** كالتالي:

وضعت الأجنة في المحلول A الموجود في طبق أحادي الحجرة (one –well dish) وبدرجة حرارة 37 مئوية بعد قص السدادة العلوية للقشة وهي ضمن الآزوت السائل ثم استُقبلت الأجنة في المحلول A الموجود في طبق بتري دائري لمدة 1 دقيقة، ثم أُخرجت الأجنة ووضعت في المحلول B الموجود في طبق بتري دائري لمدة 3 دقيقة بدرجة حرارة 25 مئوية ثم غُسلت (شُطفت) الأجنة 4–5 مرات في الوسط الزرعي TCM-199، ثم زُرعت في الوسط الزرعي الخاص بالانقسامات وغُطيت بزيت البارافين وأُعيدت إلى الحاضنة من اجل استئناف نموها و استكمال وصولها إلى مرحلة الكيس الأصلي الناتش .

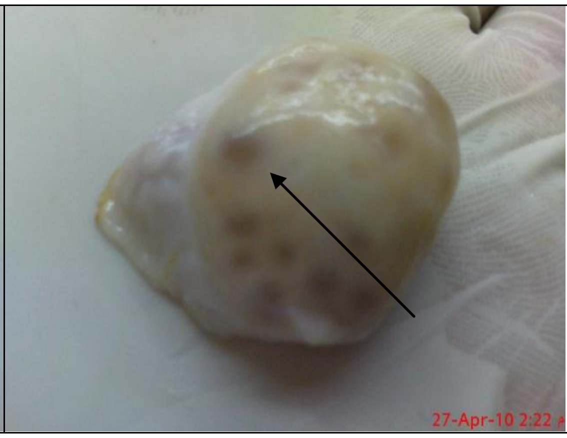
12– تحديد حيوية الأجنة (البقاء) بعد الإذابةDetermination of Embryos Viability (Survivability):

حُددت حيوية الأجنة وبقائها بعد التجميد وتمييزها عن الأجنة المتوقفة (الصورتين23,22) حسب **Moussa وزملاؤه (2005)** وذلك عن طريق مراقبة زيادة عدد الخلايا في الأجنة المبكرة أما الأجنة في مرحلة التويتة والكيس الأصلي فقد حددت حيويتها وتطورها اللاحق حسب عودة تمدد الجنين إلى الحجم الأصلي بعد عملية التجميد والزيادة في قطرها الخارجي ووصول الأجنة إلى مرحلة الكيس الأصلي الفاقس (الصورة24).

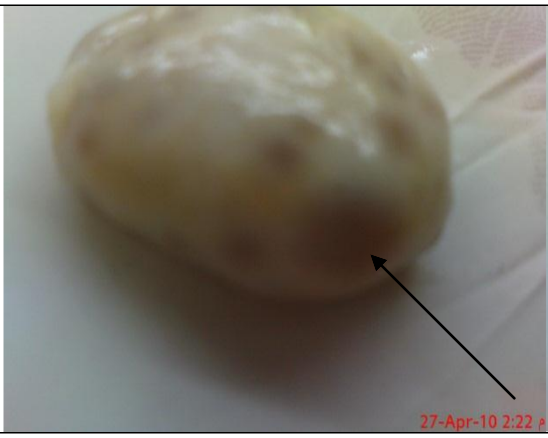
13– التحليل الإحصائي Statistical Analysis:

حُللت نتائج تأثير فصل السنة، عمر الحيوان، التداخل بين عمر الحيوان وفصل السنة، قطر البويضة، قطر الحويصلة المبيضية، مستوى هرمون FSH، مستوى السيستامين، مراحل تطور النوى و نوع مانع التجميد وأثره في معدلات الأجنة المجمدة الباقية والمتراجعة والمحسوبة كنسبة مئوية وتحديد معنوية العوامل المدروسة عند مستويي المعنوية $P<0.01$ و$P<0.05$ بتطبيق طريقة مربع كاي (**Chi-square**) وفق الإجراء Contingency tables وطُبقت طريقة اختبار فيشر الدقيقة **Fisher's exact test** في المقارنات الزوجية للنسب المئوية (Post hoc) حسب **Chen وزملاؤه (2005)**، واستُخدم لهذا الغرض البرنامج الإحصائي البرمجي SAS,9 .

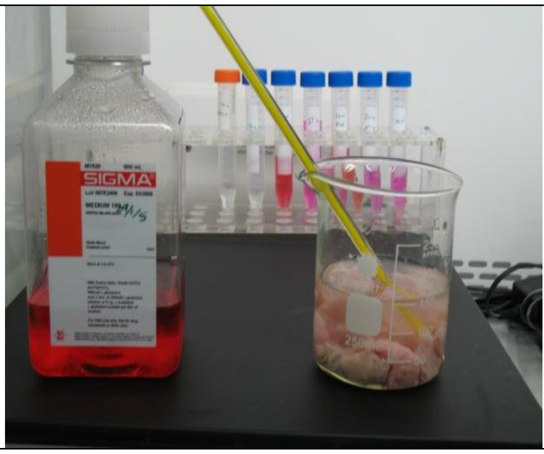
All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit



صورة (1) مبيض أغنام سليم يحتوي حويصلات مبيضية بحجوم متغايرة



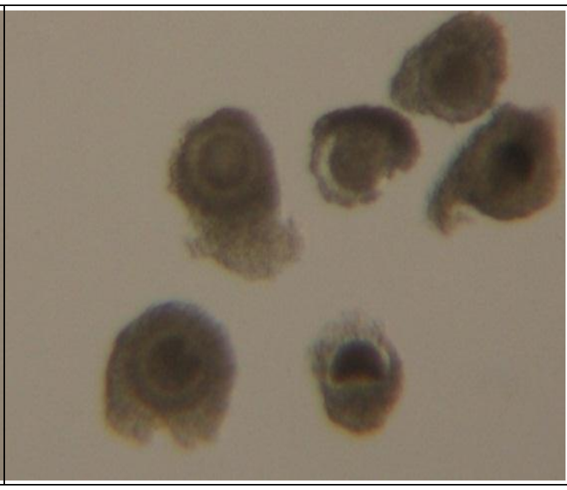
صورة(2) مبيض أغنام سليم يحتوي حويصلة >3مم (السهم)



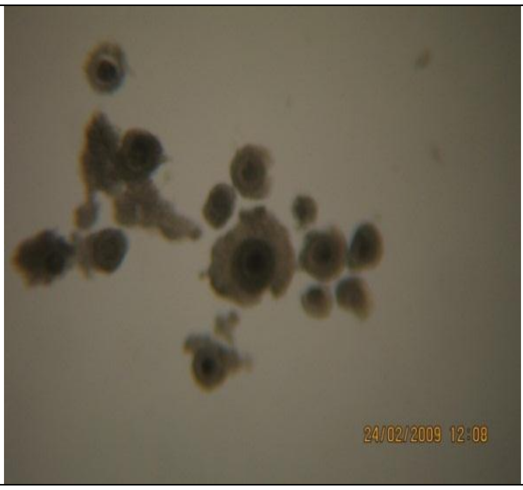
صورة (3) تحضير المبايض لعملية التشريط فوق طاولة تسخين بدرجة حرارة 39 مئوية في المختبر



صورة (4) المكبرة والمجهر المعكوس المعدان لفحص البويضات

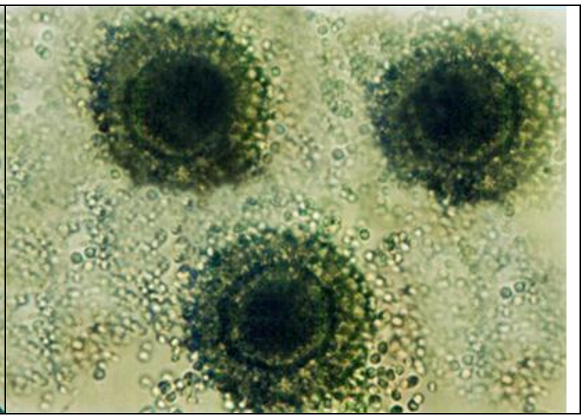


صورة(5) معقد البويضات COCs مع طبقات مختلفة العدد من الخلايا الركامية

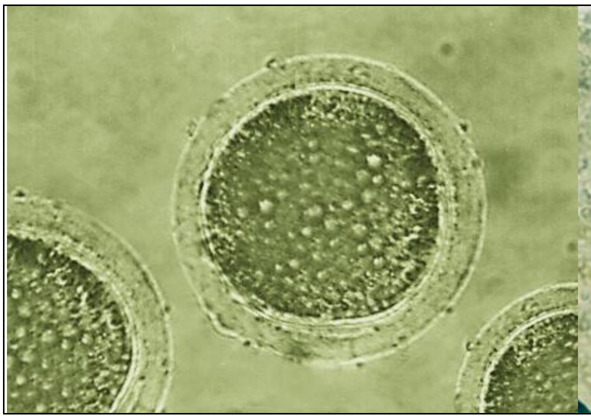


صورة(6) معقد البويضات COCs مع طبقات مختلفة العدد من الخلايا الركامية

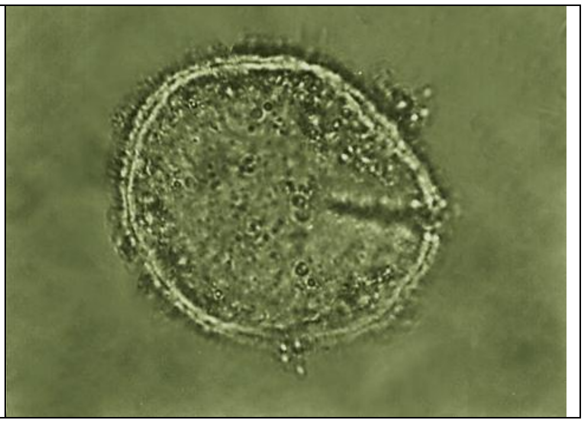
All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit



صورة (7) بويضات أغنام محاطة بأكثر من طبقتين من الخلايا الركامية



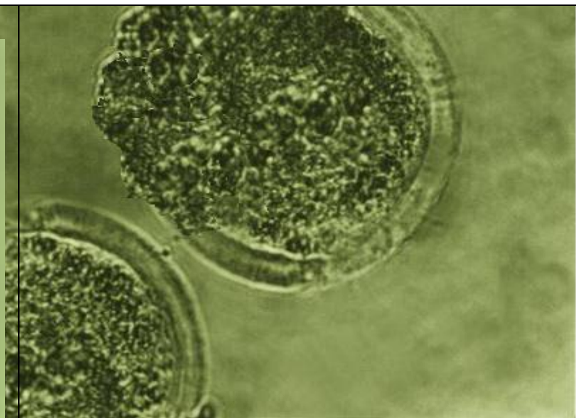
صورة (8) بويضات أغنام عارية من الخلايا الركامية وذات تشوه سيتوبلاسمي(فقاعات)



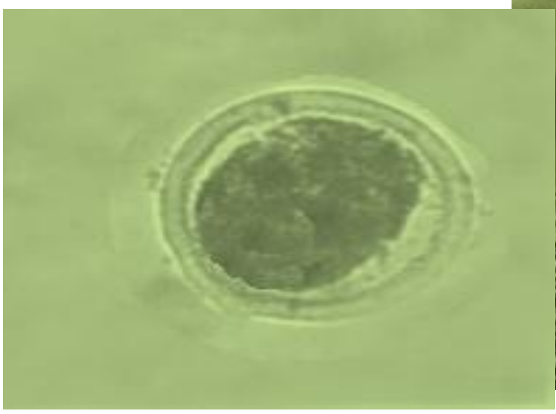
صورة(9) بويضة أغنام مشوهة فاقدة للسيتوبلاسم مع حدوث انكسار للنطاق الشفاف



صورة(10) بويضات أغنام عارية وخالية تماماً من الخلايا الركامية

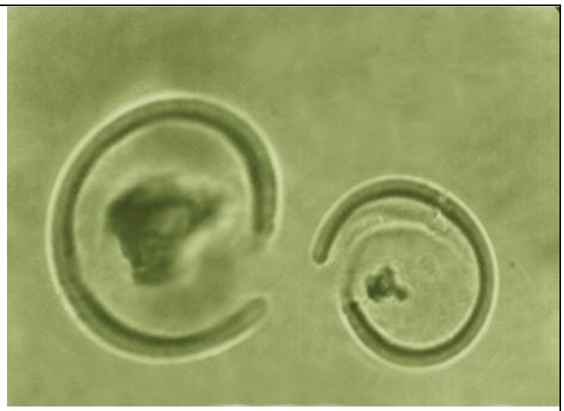


صورة(11) بويضات أغنام مشوهة مع حدوث تحلل في السيتوبلاسم

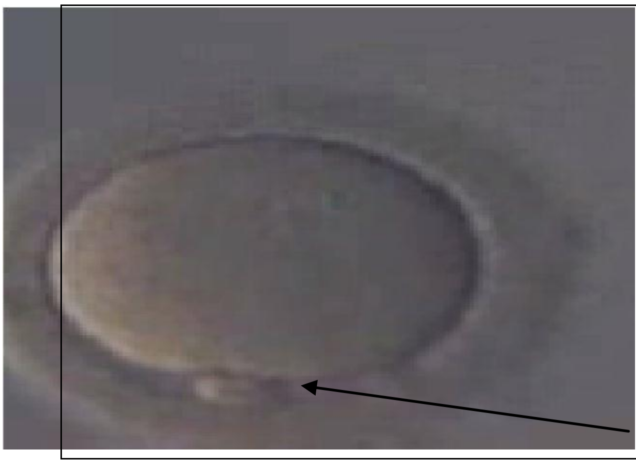


صورة(12) بويضة أغنام مشوهة مع حدوث انحسار في السيتوبلاسم

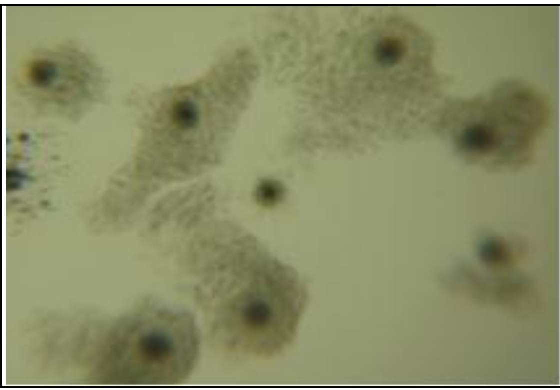
All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit



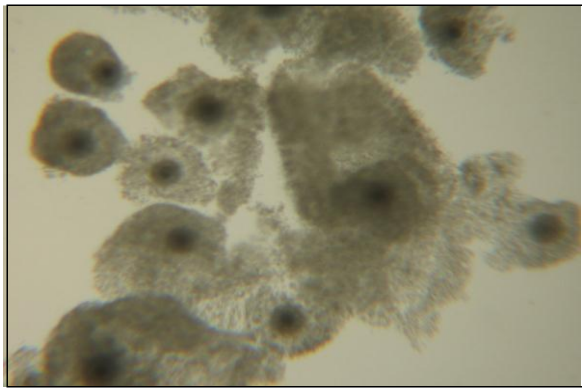
صــورة(13) بويضــات أغنــام مشــوهة فاقــدة كليــاً للسيتوبلاسم



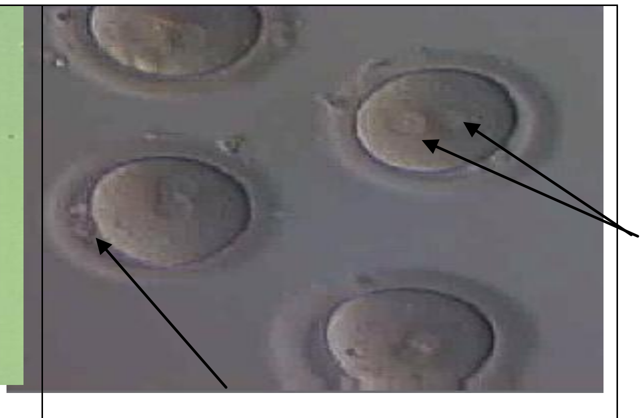
صورة (14) بويضة أغنام ناضجة (M-I) مع ظهور الجسم القطبي الأول (السهم)



صورة(15) بويضات أغنام ناضجة مع تمدد واضح للخلايا الركامية



صورة(16) بويضات أغنام ناضجة مع تمدد واضح للخلايا الركامية



صورة (17) بويضات أغنام مخصبة مع ظهور الجسم القطبي الثاني البداءات النووية الذكرية والأنثوية (الأسهم)

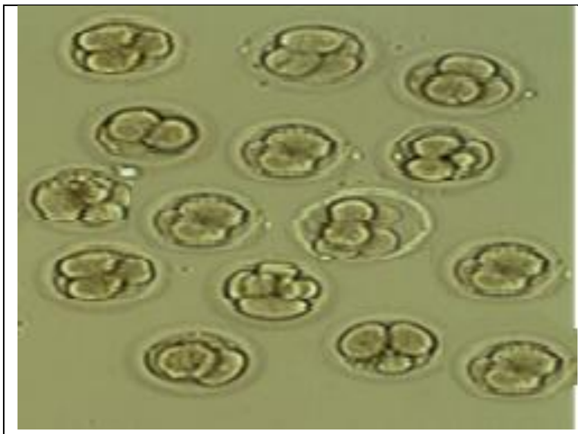


صورة(18) بويضات أغنام منقسمة (2-4) خلية

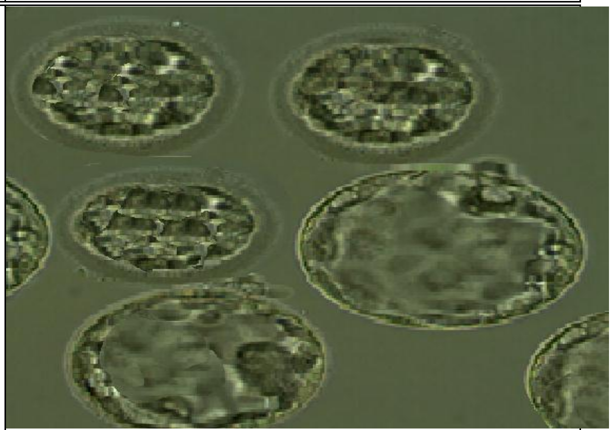
All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit



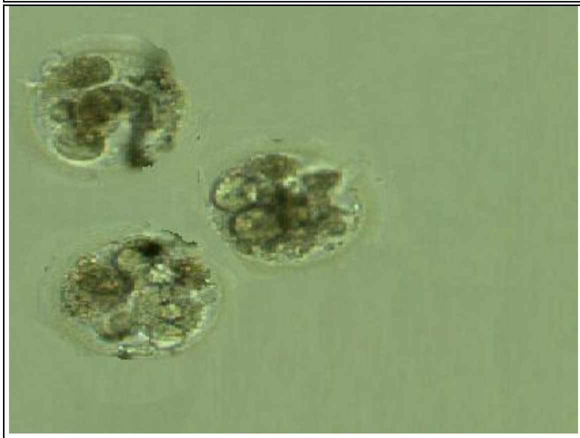
صورة(19) بويضات أغنام منقسمة (4−5) خلية



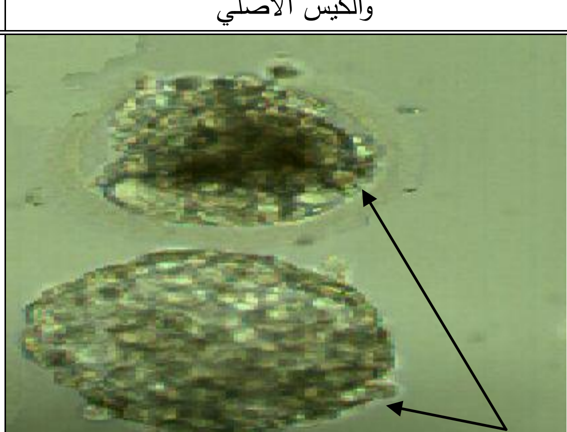
صورة(20) بويضات أغنام منقسمة (3−7) خلية



صورة(21) بويضات أغنام منقسمة في مرحلة التويتة والكيس الأصلي



صورة (22) بويضات أغنام متوقفة عند مراحل مختلفة (بلاستومير) من الانقسام بعد الإذابة



صورة (23) بويضات أغنام متوقفة عند مرحلة التويتة(الأعلى) والكيس الأصلي(أسفل) بعد الإذابة



صورة(24) بويضات أغنام منقسمة في مرحلة الكيس الأصلي الفاقس

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

الفصل الثالث

النتائج

Results

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

1–تأثير عمر نعاج العواس وفصل السنة في إنضاج البويضات وإخصابها وانقسامها مخبرياً

أ– تأثير عمر النعاج المانحة:

بينت النتائج (الجدول4) أن المعدل العام لإنضاج بويضات الأغنام مخبرياً بلغ 52.23% وكان لعمر النعاج المانحة تأثير معنوي(P > 0.01) في نسب البويضات الناضجة، إذ تفوقت نعاج المجموعة B (1– 2 سنة)على نعاج المجموعتين A وC الأصغر والأكبر عمراً وبلغت القيم 62.67 % مقابل48.92 % و46.34 % على التوالي، وبفارق وصل إلى 16.28% بين أعلى القيم وأدناها.

كما توضح محتويات الجدول 4 أن المعدل العام للإخصاب بلغ 30.05% ، ولم يكن الفرق معنوياً بين المجموعات في هذا المؤشر رغم استمرار تفوق المجموعة B (33.20 %) على المجموعتين الباقيتين وبفارق 6.45% .

كما أظهرت نتائج الدراسة (الجدول4) أن المعدل العام لانقسام البويضات المخصبة بلغ 30.84% مع عدم وجود تأثير معنوي لعمر النعجة المانحة في تطور البويضات المخصبة، إذ كانت نسب الانقسام المخبري متقاربة جداً بين المجموعات المدروسة و لم يتجاوز الفرق 2.3%.

الجدول 4. معدلات إنضاج بويضات أغنام العواس وإخصابها وتنميتها مخبرياً وفقاً لفئاتها العمرية

عمر النعاج (سنة)		البويضات المحضنة	البويضات الناضجة		البويضات المخصبة		البويضات المنقسمة	
		عدد	عدد	%	عدد	%	عدد	%
A	1 >	466	228	48.92[a]	61	26.75[a]	18	29.50[a]
B	2 -1	418	262	62.67[b]	87	33.20[a]	27	31.03[a]
C	2 <	479	222	46.34[a]	66	29.72[a]	21	31.81[a]
الكلي		**1363**	**712**	**52.23**	**214**	**30.05**	**66**	**30.84**
Sig			**		NS		NS	

NS : غير معنوي، ** (P > 0.01)، يشير تشابه الأحرف في العمود الواحد إلى عدم وجود فرق معنوي بين المعدلات

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

ب- تأثير فصل السنة :

يلاحظ من محتويات الجدول (5) أن فصل السنة أثر معنوياً (P < 0.01) في إنضاج بويضات الأغنام مخبرياً إذ بلغت أعلاها في فصلي الصيف والخريف 56.87 % و 57.98%، على التوالي في الوقت الذي لم تتجاوز النسبة في فصلي الشتاء والربيع عن 43.52% و 49.29% وبفارق نسبي بلغ 14.46% بين البويضات الناضجة مخبرياً في فصلي الخريف و الشتاء.

من ناحية أخرى، أثر فصل السنة معنوياً (P < 0.01) في معدلات الإخصاب المخبري للبويضات إذ بلغت أعلاها لبويضات الأغنام التي جمعت في فصل الصيف (37.91%) وأدناها في فصل الشتاء (16.03%) وبفارق وصل إلى 21.88 % .

الجدول 5. معدلات إنضاج بويضات أغنام العواس وإخصابها وتنميتها مخبرياً وفقاً لفصول السنة

فصل السنة	البويضات المحضنة	البويضات الناضجة		البويضات المخصبة		البويضات المنقسمة	
	عدد	عدد	%	عدد	%	عدد	%
الشتاء	301	131	43.52^{a}	21	16.03^{a}	0	0
الربيع	353	174	49.29^{a}	46	26.43^{b}	15	32.60^{a}
الصيف	371	211	56.87^{b}	80	37.91^{c}	29	36.25^{a}
الخريف	338	196	57.98^{b}	67	34.18^{dc}	22	32.83^{a}
الكلي	**1363**	**712**	**52.23**	**214**	**30.05**	**66**	**30.84**
Sig		**		**		NS	

NS : غير معنوي، ** (P < 0.01)، يشير تشابه الأحرف في العمود الواحد إلى عدم وجود فرق معنوي بين المعدلات

على الرغم من عدم وجود اختلاف معنوي في نسب انقسام البويضات المخصبة بين فصول السنة فقد أظهرت الدراسة فشل البويضات المخصبة في فصل الشتاء في الانقسام في الوقت الذي سجلت أعلى نسبه للانقسام في فصل الصيف (36.25%) و لم تتجاوز الفروق في نسب الانقسام المخبري أكثر من 3.65 %.

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

جـ- تأثير التداخل بين فصل السنة وعمر النعاج:

جـ-1- الإنضاج المخبري:

تبين محتويات الجدول (6) وجود فرق معنوي (P < 0.01) بين معدل إنضاج بويضات نعاج العواس A، وB، وC المتباينة في العمر خلال فصول السنة المختلفة، ولقد كان معدل البويضات التي جمعت خلال فصل الصيف الأعلى في نعاج المجموعة A (الأصغر من سنة) و نعاج المجموعة C (> 2 سنة) وبلغت القيم 58.59 % ، و 50% على التوالي مقارنة مع نظيراتها التي جمعت خلال فصول السنة الأخرى، أما النعاج التي أعمارها بين 1-2 سنة (المجموعةB) فكانت معدلات إنضاج البويضات التي جمعت في فصل الخريف هي الأعلى (72.04%) مقارنة مع الفصول الأخرى، أما عن تأثير العمر خلال نفس الفصل في معدلات الإنضاج يلاحظ أن هناك تبايناً بين الفصول المختلفة فقد جاء معدل إنضاج بويضات نعاج المجموعة B الأعلى في جميع فصول السنة ولكن بقيم مختلفة فبينما لم يكن الفرق معنوياً في فصل الربيع كان معنوياً في الفصول الأخرى.

جـ-2 الإخصاب المخبري:

تشير النتائج (الجدول 7) إلى وجود فرق معنوي (P < 0.01) بين معدل إخصاب البويضات في مجموعات النعاج السابقة وفقاً لفصول السنة المختلفة وتبين أن بويضات النعاج التي جمعت خلال فصل الصيف قد أخصبت مخبرياً وبصورة اكبر في نعاج المجموعتين A (30.66%) و المجموعة B (46.47%) مقارنة مع نظيراتها التي جمعت خلال فصول السنة، أما النعاج في المجموعة C فكانت معدلات إخصاب البويضات التي جمعت منها في فصل الخريف هي الأعلى (37.09%).

وعند دراسة تأثير العمر خلال نفس الفصل في معدلات الإخصاب يلاحظ أن هناك تبايناً بين الفصول المختلفة فقد جاء معدل إخصاب بويضات نعاج المجموعة B الأعلى في فصلي الصيف (P< 0.01) والخريف (P< 0.05) و لم يكن الفرق معنوياً في فصلي الشتاء و الربيع.

جـ-3- الانقسام المخبري:

لم يلحظ وجود تأثير معنوي في معدل انقسام البويضات بين المجموعات العمرية لنعاج العواس حسب الفصول، كما تشير النتائج إلى الفشل التام للبويضات في الانقسام خلال فصل الشتاء في جميع المجموعات العمرية المدروسة ويلاحظ من الجدول (8) أن بويضات الأغنام التي

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

جمعت في فصل الصيف أعطت أعلى معدلات انقسام مخبري في المجموعات العمرية المدروسة وبلغت القيم 34.78 % ، و 36.36 % ، و37.50% على التوالي.

لم تلحظ فروق معنوية في معدلات الانقسام المخبري عند دراسة تأثير أعمار النعاج المانحة خلال نفس الفصل، رغم ارتفاع هذه المعدلات في المجموعتين B وC في فصل الصيف.

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

الجدول6. معدل إنضاج بويضات أغنام العواس مخبرياً وفقاً لمجموعات العمر وفصول السنة

عمر النعاج / فصل السنة	المجموعة A (أقل من سنة)			المجموعة B (1– 2) سنة			المجموعة C (> 2) سنة			Sig
	البويضات المحضنة	البويضات الناضجة		البويضات المحضنة	البويضات الناضجة		البويضات المحضنة	البويضات الناضجة		
	عدد	عدد	%	عدد	عدد	%	عدد	عدد	%	
الشتاء	103	30	29.12^{Aa}	95	61	64.21^{Ba}	103	40	38.83^{Aa}	**
الربيع	115	56	48.69^{Ab}	117	63	53.84^{Ab}	121	55	45.45^{Ab}	NS
الصيف	128	75	58.59^{ABc}	113	71	62.83^{Aa}	130	65	50.00^{Bb}	*
الخريف	120	67	55.83^{Adc}	93	67	72.04^{Bc}	125	62	49.60^{Ab}	**
الكلي	**466**	**228**	**48.92**	**418**	**262**	**62.67**	**479**	**222**	**46.34**	
Sig	**			**			**			

** (P < 0.01)، : يشير تشابه الأحرف إلى عدم وجود فرق معنوي بين المعدلات(الأحرف الصغيرة في العمود الواحد والأحرف الكبيرة في السطر الواحد)

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

الجدول 7 . معدل إخصاب بويضات نعاج العواس مخبرياً وفقاً لمجموعات العمر وفصول السنة

عمر النعاج / فصل السنة	المجموعة A (أقل من سنة)			المجموعة B (1 − 2) سنة			المجموعة C (> 2) سنة			
	البويضات الناضجة	البويضات المخصبة		البويضات الناضجة	البويضات المخصبة		البويضات الناضجة	البويضات المخصبة		Sig
	عدد	عدد	%	عدد	عدد	%	عدد	عدد	%	
الشتاء	30	4	13.33^{Aa}	61	10	16.39^{Aa}	40	7	17.50^{Aa}	NS
الربيع	56	16	28.57^{Ab}	63	18	28.57^{Ab}	55	12	21.81^{Ab}	NS
الصيف	75	23	30.66^{Acb}	71	33	46.47^{Bc}	65	24	36.92^{Ac}	**
الخريف	67	18	26.86^{Adcb}	67	26	38.80^{Bd}	62	23	37.09^{Bdc}	*
الكلي	**228**	**61**	**26.75**	**262**	**87**	**33.20**	**222**	**66**	**29.72**	
Sig	**			**			**			

** (P < 0.01)، : يشير تشابه الأحرف إلى عدم وجود فرق معنوي بين المعدلات(الأحرف الصغيرة في العمود الواحد والأحرف الكبيرة في السطر الواحد)

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

الجدول 8. معدل انقسام بويضات نعاج العواس مخبرياً وفقاً لمجموعات العمر وفصول السنة

عمر النعاج / فصل السنة	المجموعة A (أقل من سنة)			المجموعة B (1− 2) سنة			المجموعة C (> 2) سنة			Sig
	البويضات المخصبة	البويضات المنقسمة		البويضات المخصبة	البويضات المنقسمة		البويضات المخصبة	البويضات المنقسمة		
	عدد	عدد	%	عدد	عدد	%	عدد	عدد	%	
الشتاء	4	0	0	10	0	0	7	0	0	NS
الربيع	16	5	31.25^{Aa}	18	6	33.33^{Aa}	12	4	33.33^{Aa}	NS
الصيف	23	8	34.78^{Aa}	33	12	36.36^{Aa}	24	9	37.50^{Aa}	NS
الخريف	18	5	27.77^{Aa}	26	9	34.61^{Aa}	23	8	34.78^{Aa}	NS
الكلي	**61**	**18**	**29.50**	**87**	**27**	**31.03**	**66**	**21**	**31.81**	
Sig	NS			NS			NS			

NS: غير معنوي، : يشير تشابه الأحرف إلى عدم وجود فرق معنوي بين المعدلات(الأحرف الصغيرة في العمود الواحد والأحرف الكبيرة في السطر الواحد)

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

2–تأثير حجم الحويصلة المبيضية وقطر البويضة في معدلات إنضاج وإخصاب وانقسام بويضات نعاج العواس مخبرياً

أ- تأثير حجم الحويصلة:

أظهرت النتائج (الجدول 9) أن نسبة عالية من البويضات المأخوذة من حويصلات المجموعة A (<1مم) فشلت في الوصول إلى مرحلة الإنضاج. بينما أظهرت البويضات المأخوذة من مجموعتي الحويصلات C(2–3 مم) و D (≤3 مم) تفوقاً واضحاً(P<0.01) في نسبة الإنضاج وبلغت 70.83 و56.25% في المجموعتين على التوالي مقارنة مع نظيراتهما المأخوذة من المجموعتين A (10.67%) و B (28.97%) وبفارق وصل إلى 60.16 %. كما يتضح من محتويات الجدول (9) أن بويضات المجموعتين A وB فشلتا في الوصول إلى مرحلة الإخصاب، في حين أخصبت البويضات المأخوذة من حويصلات المجموعتين C وD ولكن بنسب متفاوتة(P<0.01) وصلت إلى 26.98% و 61.76% على التوالي، كما لم يلحظ وجود فرق معنوي في استمرارية نمو وانقسام البويضات المخصبة في المجموعتين C وD (29.41% و33.33%).

الجدول 9. معدل إنضاج بويضات أغنام العواس وإخصابها وانقسامها مخبرياً وفقاً لحجم الحويصلة

قطر الحويصلة (مم)		البويضات المحضنة	البويضات الناضجة		البويضات المخصبة		البويضات المنقسمة	
		عدد	عدد	%	عدد	%	عدد	%
A	1>	103	11	10.67 a	0	0	0	0
B	1– >2	107	31	28.97 b	0	0	0	0
C	2 – >3	112	63	56.25 c	17	26.98 a	5	29.41 a
D	≤3	96	68	70.83 d	42	61.76 b	14	33.33 a
الكلي		**418**	**173**	**41.38**	**59**	**34.10**	**19**	**32.20**
Sig			**		**		NS	

NS : غير معنوي، ** (P < 0.01) ، : يشير تشابه الأحرف إلى عدم وجود فرق معنوي في العمود نفسه بين المعدلات

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

ب- تأثير قطر البويضة:

أظهرت النتائج (الجدول10) أن بويضات المجموعتين C و D والتي أقطارها اكبر من 110 مايكرومتر أعطت أعلى نسبة إنضاج مخبري (P>0.01) بلغت 72.30% و82.02% على التوالي، مقارنةً بالبويضات الخاصة بالمجموعتين A و B والتي قلت معدلات إنضاجها مخبرياً لتصل 6.16% و 37.28%، على التوالي .

أما بالنسبة لنتائج الإخصاب فقد لوحظ أن بويضات المجموعة A فشلت في إتمام الإخصاب والانقسام، بينما لم يلحظ وجود فرق معنوي بين المجموعاتB و C و D في نسب إخصاب البويضات، إذ بلغت أعلى نسبة إخصاب في بويضات المجموعة D 42.46%، وأدناها في مجموعة B وبلغت 22.72%. كما أظهرت الدراسة عدم وجود فرق معنوي في نسبة انقسام البويضات المخصبة للمجموعتين C و D والبالغة 33.33 %و 41.93 %، على التوالي

الجدول 10. معدل إنضاج بويضات أغنام العواس وإخصابها وانقسامها مخبرياً وفقاً لقطر البويضة

قطر البويضة (مايكرو متر)		البويضات المحضنة	البويضات الناضجة		البويضات المخصبة		البويضات المنقسمة	
		عدد	عدد	%	عدد	%	عدد	%
A	100>	146	9	6.16 [a]	0	0	0	0
B	110>−100	118	44	37.28 [b]	10	22.72 [a]	0	0
C	120>−110	65	47	72.30 [c]	18	38.29 [a]	6	33.33 [a]
D	120≤	89	73	82.02 [d]	31	42.46 [a]	13	41.93 [a]
الكلي		**418**	**173**	**41.38**	**59**	**34.10**	**19**	**32.20**
Sig			**		NS		NS	

NS : غير معنوي ** (P < 0.01)، يشير تشابه الأحرف إلى عدم وجود فرق معنوي في العمود نفسه بين المعدلات

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

3-تأثير مستويات هرمون FSH في إنضاج بويضات نعاج العواس، وإخصابها، وانقساماتها اللاحقة مخبرياً

أظهرت النتائج (الجدول11) أن معدلات الإنضاج المخبري لبويضات نعاج العواس اختلفت وفقاً لتركيز هرمون الـ FSH المضاف وتراوحت بين 65.56% (الشاهد) و83.66% (المجموعةF)، ولم يكن للتراكيز المنخفضة (حتى 5 مايكرو غرام /مل) تأثيراً معنوياً في معدلات الإنضاج 65.89% (المجموعة B)، و66.87% (المجموعة C)، و72.96% (المجموعة D)، في حين كان للتركيزين 50 (المجموعة E) و75 مايكروغرام / مل (المجموعة F) تأثير معنوي (P<0.01) مقارنة مع المجموعات الأخرى و بلغت قيمهما 83.56% و83.66% على التوالي، ووصلت الفروق بين أعلى قيمة (المجموعة F) واقل قيمة (المجموعة A) إلى 18.1 % .

كما و أظهرت النتائج (الجدول 11) عدم وجود تأثير معنوي لتراكيز هرمون FSH في نسبة إخصاب البويضات إذ تراوحت بين 41.77%(الشاهد)، و44.38%(المجموعة F) علماً أن نسب البويضات المخصبة للمجموعتينE وF كانت أفضل مقارنة مع المجموعات الأقل تركيز، ولم يتجاوز الفرق بين القيمة الأعلى والقيمة الأدنى 3.25 % .

كذلك لم يلحظ وجود تأثير معنوي لمستويات هرمون الـ FSH في المجموعات السابقة في انقسام البويضات بعد الإخصاب رغم ارتفاع تلك النسب في المجموعتين E و F وبفروق نسبية بسيطة مقارنة مع نظيراتها في المجموعات الباقية (37.35% و37.33%) ولم تتجاوز هذه الفروقات بين القيمة الأعلى و الأدنى 1.87% (الجدول11).

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

الجدول 11. معدلات إنضاج بويضات أغنام العواس، وإخصابها، وانقسامها مخبرياً وفقاً لتراكيز هرمون **FSH**

تركيز FSH (مايكروغرام/مل)		البويضات المحضنة	البويضات الناضجة		البويضات المخصبة		البويضات المنقسمة	
		عدد	عدد	%	عدد	%	عدد	%
A	شاهد	241	158	65.56 [a]	66	41.77 [a]	24	36.36 [a]
B	0.1	214	141	65.89 [a]	58	41.13 [a]	21	36.21 [a]
C	1	217	145	66.82 [a]	62	42.76 [a]	22	35.48 [a]
D	5	233	170	72.96 [a]	73	42.94 [a]	27	36.99 [a]
E	50	225	188	83.56 [b]	83	44.15 [a]	31	37.35 [a]
F	75	202	169	83.66 [b]	75	44.38 [a]	28	37.33 [a]
الكلي		**1332**	**971**	**72.89**	**417**	**42.94**	**153**	**36.69**
Sig			**		NS		NS	

NS : غير معنوي، ** (P < 0.01)، : يشير تشابه الأحرف إلى عدم وجود فرق معنوي في العمود نفسه بين المعدلات

كما دلت النتائج (الجدول12) على وجود تأثير معنوي (P<0.01) لتراكيز هرمون FSH في انقسام البويضات خلال مرحلة (2−16) خلية إذ لوحظ ارتفاع نسبة البويضات في هذه المرحلة في المجموعة C(81.81%) بالمقارنة مع المجموعات الأخرى الأقل والأكثر تركيزاً وبفارق كلي بلغ 29.89% بين أعلى وأدنى نسبة في هذه المرحلة.

وأظهرت النتائج وجود تأثير معنوي (P<0.05) للتراكيز المختلفة لهرمون الـ FSH في انقسام البويضات في مرحلة الجسم التوتي (التويتة) في المجموعات السابقة ،إذ لوحظ ارتفاع في نسبة بويضات المجموعة E (38.70%) التي وصلت إلى مرحلة التويتة بالمقارنة مع المجموعات الأخرى، ووصل الفارق بين القيمة الأعلى (المجموعة E) والقيمة الأدنى (المجموعةC) 29.61 % . لم يلحظ وجود فرق معنوي للتراكيز المختلفة لهرمون الـ FSH في

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

استمرار تطور البويضات ووصولها إلى مرحلة الكيس الأصلي وأظهرت المجموعة F تفوقاً ظاهراً(25%) على باقي المجموعات التي وصلت إلى هذه المرحلة .

الجدول12. معدلات انقسام بويضات أغنام العواس الناضجة والمخصبة مخبرياً خلال المراحل المختلفة لتطور الأجنة وفقاً لتراكيز هرمونFSH

تركيز FSH (مايكروغرام/مل)		البويضات المنقسمة	مراحل تطور الأجنة: الأجنة المتوقفة عند مرحلة (2–16) خلية		الأجنة المتوقفة عند مرحلة التويتة		الكيس الأصلي	
		عدد	عدد	%	عدد	%	عدد	%
A	شاهد	24	17	70.83[a]	3	12.50[a]	4	16.67[a]
B	0.1	21	16	76.19[a]	3	14.28[a]	2	9.52[a]
C	1	22	18	81.81[a]	2	9.090[a]	2	9.09[a]
D	5	27	17	62.96[a]	6	22.22[b]	4	14.81[a]
E	50	31	12	38.70[b]	12	38.70[c]	7	22.58[a]
F	75	28	11	39.28[b]	10	35.71[c]	7	25.00[a]
الكلي		**153**	**91**	**59.47**	**36**	**23.52**	**26**	**16.99**
Sig			**		*		NS	

NS : غير معنوي، * (P<0.05) ، ** (P > 0.01) ، يشير تشابه الأحرف إلى عدم وجود فرق معنوي في العمود نفسه بين المعدلات

4–تأثير مستوى السيستامين Cysteamine في إنضاج بويضات نعاج العواس، وإخصابها، وانقساماتها اللاحقة مخبرياً

أظهرت النتائج (الجدول13) أن تأثير استخدام السيستامين في إنضاج بويضات نعاج العواس مخبرياً قد اختلف باختلاف تركيزه، وتبين أن استخدامه بتركيز 100 مايكرومولر أدى إلى أعلى نسبة إنضاج مخبري(80.57%) في المجموعة B (P<0.05) مقارنة مع التراكيز الأخرى أو مع مجموعة الشاهد (A)

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

كما لم تؤثر التراكيز المستخدمة من السيستامين بصورة معنوية (الجدول13) في إخصاب البويضات مخبرياً في المجموعات السابقة رغم التفوق الظاهري البسيط لتركيزه في المجموعة C (44.79%) على بقية المجموعات. ولقد جاءت نسب الإخصاب متقاربة بين المجموعات السابقة إذ بلغ الفارق بين القيمة الأعلى (المجموعة C) والقيمة الأدنى(المجموعةD) 7.29%.

الجدول 13. معدلات إنضاج بويضات أغنام العواس، وإخصابها، وانقسامها مخبرياً وفقاً لتراكيز السيستامين

تركيز السيستامين (مايكرومولر)		البويضات المحضنة	البويضات الناضجة		البويضات المخصبة		البويضات المنقسمة	
		عدد	عدد	%	عدد	%	عدد	%
A	شاهد	241	158	65.56 a	66	41.77 a	24	36.36 a
B	100	211	170	80.57 b	75	44.12 a	28	37.33 a
C	200	241	163	67.63 a	73	44.79 a	27	36.99 a
D	400	249	152	61.04 a	57	37.50 a	20	35.09 a
الكلي		**942**	**643**	**68.26**	**271**	**42.14**	**99**	**36.53**
Sig			*		NS		NS	

NS : غير معنوي، * (P < 0.05)، يشير تشابه الأحرف إلى عدم وجود فرق معنوي في العمود نفسه بين المعدلات

و لم يلحظ أيضا تأثير معنوي للاختلاف في تراكيز السيستامين (الجدول13) في انقسام البويضات مخبرياً بعد الإخصاب رغم تفوق المجموعة B في نسب الانقسام على المجموعات الأخرى ولكن بنسبة بسيطة لم يتجاوز 2.24% .

لوحظ وجود فرق معنوي (P<0.001) في نسب البويضات المنقسمة في مرحلة (2–16) خلية عبر المستويات السابقة للسيستامين (الجدول 14)، إذ ارتفعت نسب البويضات المنقسمة في هذه المرحلة عند المجموعتين المتطرفتين A وD وبتباين كبير مقارنة مع المجموعتين B وC .

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

كما أظهرت الدراسة وجود تباين في انقسام البويضات عند مرحلة التويتة في المجموعات السابقة، إذ لوحظ ارتفاع (P<0.05) في نسبة بويضات المجموعة B التي وصلت إلى هذه المرحلة بالمقارنة مع المجموعات الأخرى و بلغت القيمة 39.29% مع وجود فارق نسبي مرتفع بين مجموعتي B و الشاهد (26.79%) (الجدول14) .

كذلك لوحظ تباين في انقسام البويضات بعد الإخصاب في مرحلة الكيس الأصلي مخبرياً، و أبدت المجموعة B تفوقاً واضحاً(P<0.05) في نسب البويضات التي وصلت إلى مرحلة الكيس الأصلي على بقية المجموعات التي وصلت تلك المرحلة (42.86%) جدول (14).

الجدول14. معدلات انقسام بويضات أغنام العواس مخبرياً في المراحل المختلفة وفقاً لتراكيز السيستامين

تركيز السيستامين (مايكرومولر)		البويضات المنقسمة	مراحل تطور الأجنة					
			الأجنة المتوقفة عند مرحلة (2−16) خلية		الأجنة المتوقفة عند مرحلة التويتة		الكيس الأصلي	
		عدد	عدد	%	عدد	%	عدد	%
A	شاهد	24	17	70.83 a	3	12.50 a	4	16.67 a
B	100	28	5	17.86 b	11	39.29 b	12	42.86 b
C	200	27	17	62.96 a	5	18.51 a	5	18.51 a
D	400	20	14	70.00 a	3	15.00 a	3	15.00 a
الكلي		**99**	**53**	**53.53**	**22**	**22.22**	**24**	**24.24**
Sig			***		*		*	

* (P < 0.05) ، *** (P < 0.001)، يشير تشابه الأحرف إلى عدم وجود فرق معنوي في العمود نفسه بين المعدلات

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

5-دراسة مراحل تطور نوى بويضات نعاج العواس خلال الإنضاج المخبري

أظهرت النتائج (الجدول15) أن نسبة 88.60% من البويضات عند الجمع تكون متوقفة عند مرحلة الحويصلة الجرثومية الناتشة الـG.V (الصورة25) أما النسبة الباقية (11.53%) فقد بلغت مرحلة زوال الغلاف النووي (GVBD)، وتنخفض نسبة البويضات في مرحلة الحويصلة الناتشة إلى 9.67% بعد مرور 12 ساعة من زمن الإنضاج، كما يوضح الجدول وجود فروق معنوية (P <0.01) لتأثير زمن الإنضاج المخبري في تخطي البويضات لمرحلة GV وبلوغها مرحلة الـ GVBD (الصورتان 26، و27).

ومع التقدم في عملية الإنضاج المخبري يلاحظ أن هذه النسبة تنخفض تدريجياً لتصل إلى 9% بعد مرور 12 ساعة من بدء الإنضاج المخبري وذلك نتيجة انتقالها إلى مراحل أكثر تطوراً. أما البويضات التي دخلت مرحلة الـ GVBD والتي كانت نسبتها 11.53% في بداية الإنضاج المخبري يلاحظ بأنها قد وصلت إلى أعلى مستوياتها (53.84%) بعد مرور 6 ساعات من الإنضاج المخبري ولكنها تعود لتنخفض لتصل إلى 12.90% بعد مرور 12 ساعة من الإنضاج المخبري. استهلت البويضات دخولها في طور الـ Pro M-I بعد ست ساعات من الحضن المخبري (19.23%) لتصل إلى أعلى نسبة لها بعد مرور 21 ساعة (54.16%) بفرق معنوي (P <0.05) مقارنة ببقية الفواصل الزمنية الأخرى قبلها أو بعدها (الصورة 28).

كما أظهرت الدراسة أن بدء دخول البويضات طور الـ M-I كان بعد 9 ساعات من بدء الإنضاج المخبري وبنسبة 16.66% (الصورة 29)، لترتفع هذه النسبة بعد 12 ساعة من الإنضاج إلى 25.80% لتصل إلى أعلى قيمة لها (48.14%) بعد مرور 24 ساعة من الإنضاج مع وجود فروق معنوية بالنسبة للبويضات التي بلغت هذه المرحلة، أما بالنسبة لظهور طور الـ M-II فكان بعد 21 ساعة من بدء الإنضاج المخبري وبنسبة 12.5% في حين وصلت هذه النسبة إلى 71.42% (الصورة 30) بعد مرور 27 ساعة (P <0.01) (اكتمال زمن الإنضاج المخبري)، أي أن البويضات قد أتمت الإنضاج النووي خلال تلك الفترة (الشكل 8).

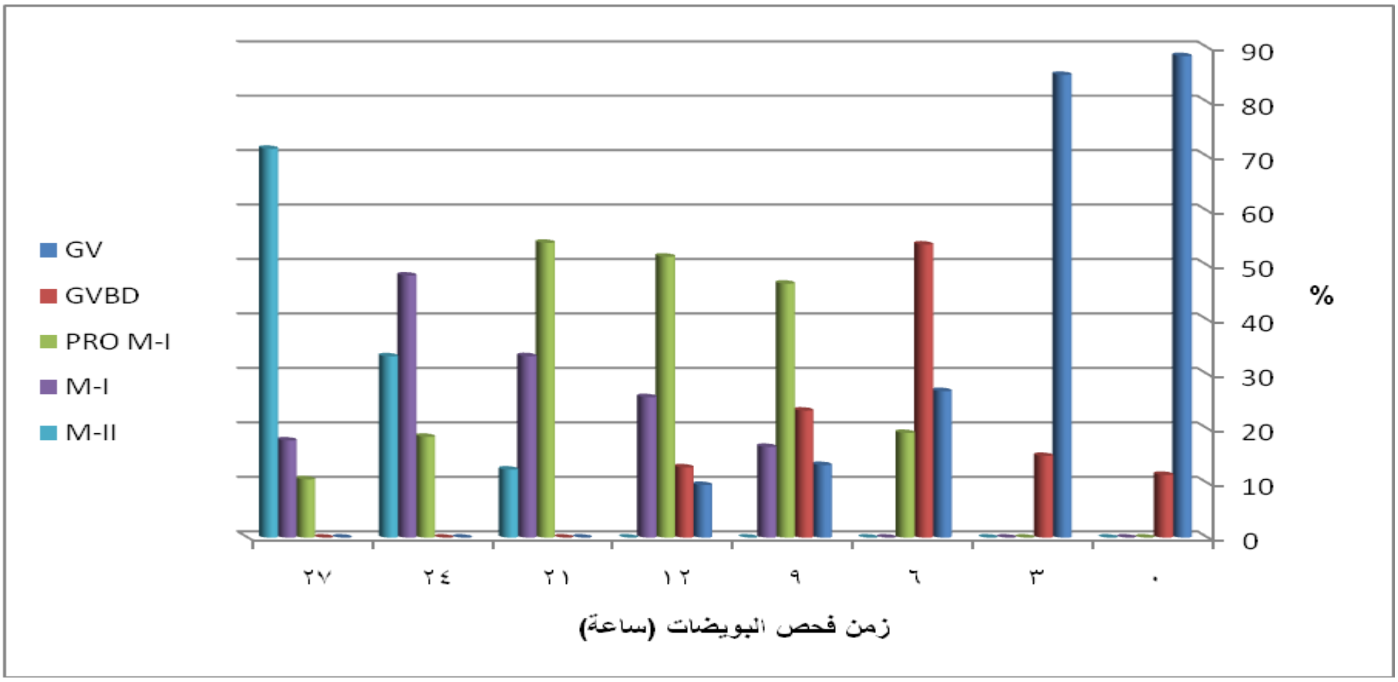
All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

الجدول 15. مراحل تطور النوى في بويضات الأغنام خلال فترات مختلفة من الإنضاج المخبري

زمن الفحص (ساعة)	البويضات المنضجة	المرحلة من الإنضاج المخبري									
		G.V		GVBD		Pro M-I		M-I		M-II	
	عدد	عدد	%	عدد	%	عدد	%	عدد	%	عدد	%
0	26	23	88.46[a]	3	11.53[a]	–	–	–	–	–	–
3	20	17	85.00[b]	3	15.00[a]	–	–	–	-	–	–
6	26	7	26.92[c]	14	53.84[b]	5	19.23[a]	–	-	–	–
9	30	4	13.33[d]	7	23.33[a]	14	46.66[b]	5	16.66[a]	–	–
12	31	3	9.670[d]	4	12.90[a]	16	51.61[b]	8	25.80[a]	–	–
21	24	–	–	–	–	13	54.16[b]	8	33.33[b]	3	12.5[a]
24	27	–	–	–	–	5	18.51[a]	13	48.14[b]	9	33.3[a]
27	28	–	–	–	–	3	10.71[a]	5	17.85[a]	20	71.42[b]
الكلي	**212**	**54**	**25.47**	**31**	**14.62**	**56**	**26.41**	**39**	**18.39**	**32**	**15.09**
Sig		**		**		*		*		**	

، * (0.05>P) ، ** (0.01 > P) ، يشير تشابه الأحرف إلى عدم وجود فرق معنوي في العمود نفسه بين المعدلات

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit



شكل2. الإنضاج النووي لبويضات نعاج العواس الناضجة مخبرياً

6-تأثير تراكيز موانع التجمد في حفظ أجنة أغنام العواس المنتجة مخبرياً وفقاً لمرحلة تطورها بطريقة التجميد السريع (التزجيج)

يوضح الجدول (16) أن معدل البقاء الكلي للأجنة المجمدة والمحفوظة في السائل الآزوت لمدة 72 ساعة والمذابة بلغ 55.23%، كما لوحظ وجود فروق معنوي (P <0.01) لتأثير نوع موانع التجميد في معدلات بقاء أجنة الأغنام بعد إذابتها، فقد ارتفع معدل بقاء الأجنة في وسط التجميد الثالث C الذي استخدم فيه مزيج متساوي التركيز من الـDMSO والـ EG مقارنة بالوسطين الأول والثاني A (DMSO) و B (EG) وبلغت القيم 76.31% مقابل 42.42 % و44.11%.

وبلغت معدلات البقاء الكلية للأجنة المجمدة بعد الإذابة في المراحل (2-16) خلية ،التويتة، والكيس الأصلي حسب موانع التجمد الثلاثة A، وB، وC في التجميد39.47% و58.62% و68.42 %، على التوالي.

لم يكن لأوساط التجميد الثلاثة فاعلية في معدلات البقاء للأجنة المجمدة في مرحلة (2-16) خلية على الرغم من ارتفاع معدل البقاء في وسط التجميد الثالث C بالمقارنة مع الوسطين A وB (50.00% مقابل 30.76% و 36.36 %)، في حين لوحظ وجود فرق

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

معنوي (P < 0.05) لنوع مانع التجمد في الأوساط السابقة في معدل البقاء للأجنة في مرحلتي التويتة والكيس الأصلي، ففي مرحلة التويتة ارتفعت معدلات البقاء لدى الأجنة المجمدة في الوسط الثالث C مقارنة مع الوسطين الآخرين A وB (90.00% مقابل 44.44% و40.00%) بينما في مرحلة الكيس الأصلي لوحظ تفوق واضح في معدل البقاء لدى الأجنة التي جمدت في الوسط الثالث C مقارنة مع نظيراتها في الوسطين الآخرين (92.85% مقابل 58.33 % و50.00%) .

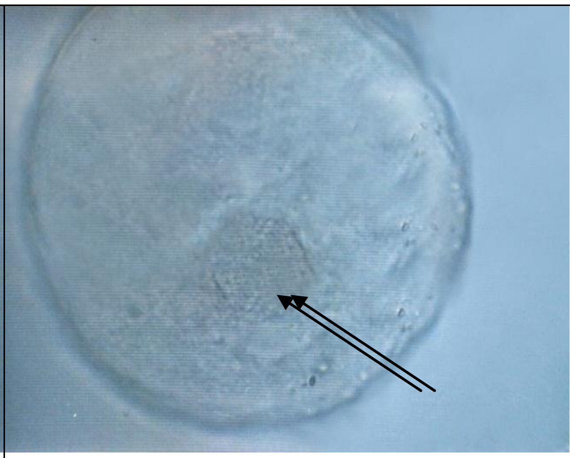
All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

الجدول 16. معدلات بقاء الأجنة المجمدة بطريقة التجميد السريع بالتزجيج حسب المراحل المختلفة

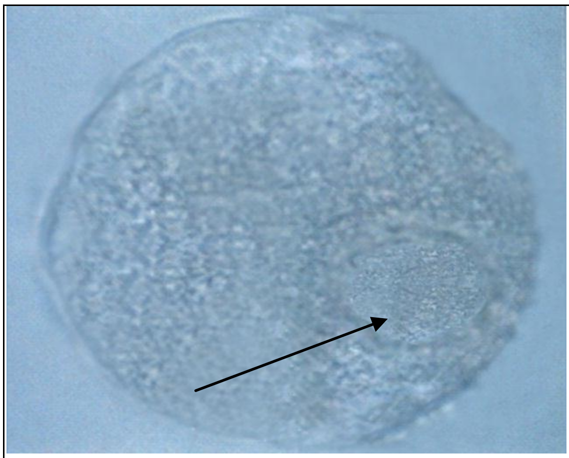
أوساط التجميد		الأجنة المجمدة	الأجنة الخاضعة لعملية التجميد وفقاً لمراحل تطورها			معدلات بقاء الأجنة بعد الإذابة وفقاً لمراحل تطورها						الأجنة المذابة الباقية (كلي)	
			(2–16) خلية	توية	كيس اصلي	(2–16) خلية		توية		كيس اصلي			
		عدد	عدد	عدد	عدد	عدد	%	عدد	%	عدد	%	عدد	%
A	DMSO	34	13	9	12	4	30.76^{a}	4	44.44^{a}	7	58.33^{a}	15	44.11^{a}
B	EG	33	11	10	12	4	36.36^{a}	4	40.00^{a}	6	50.00^{a}	14	42.42^{a}
C	DMSO+EG	38	14	10	14	7	50.00^{a}	9	90.00^{b}	13	92.85^{b}	29	76.31^{b}
الكلي		105	38	29	38	15	39.47	17	58.62	26	68.42	58	55.23
Sig						NS		*		*		**	

NS : غير معنوي، * (0.05>P) ، ** (0.01 > P)، يشير تشابه الأحرف إلى عدم وجود فرق معنوي في العمود نفسه بين المعدلات

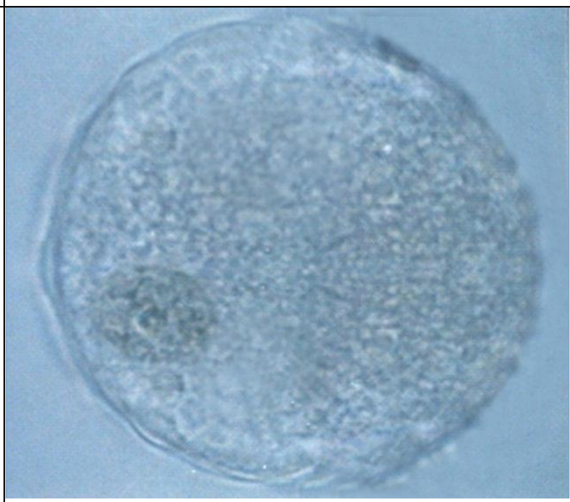
All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit



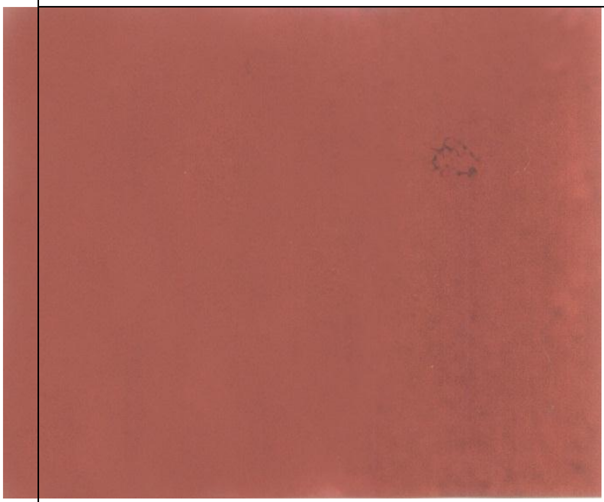
صورة(25).بويضة أغنام عند مرحلة الـGV



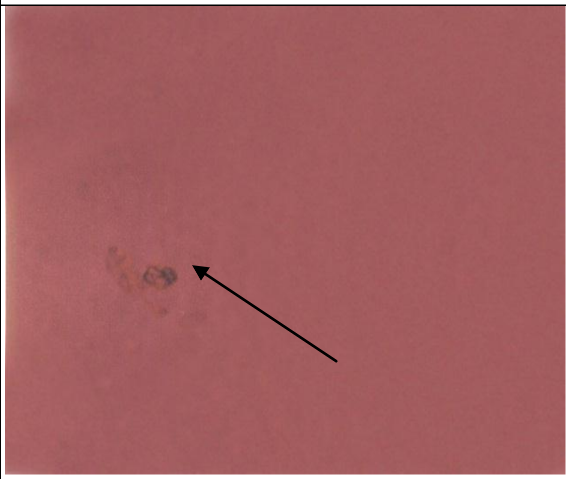
صورة(26).بويضة أغنام عند بداية مرحلة الـ GVBD



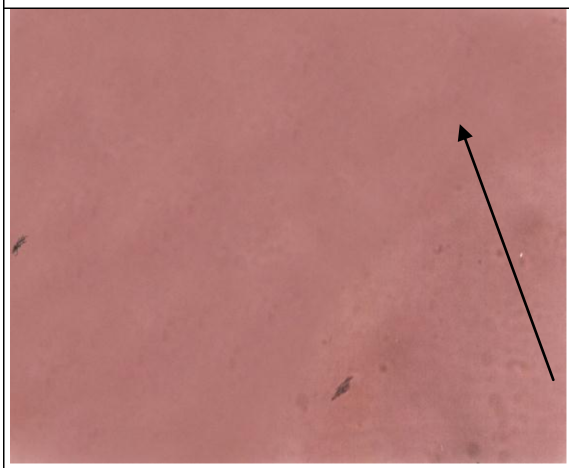
صورة(27).بويضة أغنام عند مرحلة الـGVBD مع اكتمال زوال الغلاف النووي



صورة(28).بويضة أغنام عند مرحلة الـM-I PRO



صورة(29).بويضة أغنام عند مرحلة الـM-I



صورة(30).بويضة أغنام عند مرحلة الـM-II

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

الفصل الرابع

المناقشة

Discussion

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

1-تأثير عمر نعاج العواس وفصل السنة في إنضاج البويضات وإخصابها انقسامها مخبرياً

رغم قلة الدراسات المتعلقة بتأثير عمر النعاج في قدرة البويضات على الإنضاج والإخصاب المخبري، فقد أشارت النتائج الحالية (الجدول 4) إلى وجود تأثير معنوي(P<0.01) لعمر النعاج المانحة في المجموعات A، وB، وC في معدلات إنضاج البويضات (48.92 % ، و62.67 % ، و46.34%)، وعدم وجود تأثير معنوي في معدلات الإخصاب المخبري (26.75% ، و33.20% ، و29.72%) أو في معدلات الانقسام المخبري للبويضات المخصبة (29.50% ، و31.03% ، و31.81%) وهذا يتوافق مع نتائج **Kajihara وزملاؤه (1991)** في الأبقار، و **Ptak وزملاؤه (1999b)** في الأغنام. ولم تتوافق نتائج الدراسة مع نتائج **Izquierdo وزملاؤه (1999)** الذين لم يلحظوا وجود تأثير معنوي في معدلات إنضاج البويضات التي مصدرها إناث ماعز بعمر اكبر أو اقل من سنة (غير بالغة) وحصلوا على معدلات إنضاج(71.4% ، و 81.4%) ، وإخصاب(37.5% و 44.2%)، وانقسام للبويضات المخصبة، (42.8% ، و61.8%)على التوالي. كما لم تتوافق نتائج الدراسة أيضا مع نتائج دراسة **Grazul-Bilska وزملاؤه (2006)** المجراة على نعاج بعمر > من 2 سنة وحصلوا على معدلات إنضاج مخبري 94% ومعدلات انقسام مخبري 84% بينما حصل **Motlagh وزملاؤه (2008)** على معدلات إنضاج مخبري لبويضات مأخوذة من نعاج عواس بعمر 1-2 سنة قدرت بـ 70% كما جاءت نتائج الدراسة مخالفة أيضاً لنتائج **Mogas وزملاؤه (1997)** الذين لم يلحظوا وجود تأثير معنوي بين معدلات الإنضاج المخبري لبويضات الماعز سواء كان مصدرها عنزات عمرها أكثر أو اقل من سنة ولكنها توافقت بالنسبة للإخصاب المخبري من حيث عدم وجود فرق معنوي، وبلغت نسبة الإنضاج المخبري72.4% و 64.1% على التوالي بينما بلغت نسبة الإخصاب 4.8% و 36.4%على التوالي.

إن التأثير المعنوي لعمر النعاج (P<0.01) في معدل إنضاج البويضات وغياب ذلك التأثير في معدل إخصاب البويضات وانقسامها، يمكن إرجاعه إلى اختلاف الحالة الفيزيولوجية للحيوانات المستخدمة والى إمكانية احتواء مبايضها على بويضات تختلف في درجة نموها وتطورها، ولكنها جميعاً أنهت طور النمو وبلغت القطر الذي يمكنها من استئناف عمليات الانقسام الاختزالي بعد أن أتمت تصنيع البروتينات الضرورية التي تحتاجها البويضة للوصول الى مرحلة النضج (**الطائي، 2003**). ويعود التأثير المعنوي (P<0.01) لعمر النعاج في معدل

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

الإنضاج المخبري للبويضات إلى أن معظم أفراد المجموعة B من النعاج البالغة والتي تحقق البويضات فيها نسبة عالية من الإنضاج نظراً لكون نسبة كبيرة منها ذات أقطار > 120 مايكرومتر مع الأخذ بعين الاعتبار موسمية التناسل عند أغنام العواس والذي قد يلعب دوراً كبيراً وهاماً في أحجام ومراحل الحويصلات المبيضية و انعكاس ذلك على القدرة التطورية للبويضات **(زكريا و سلهب، 1991)**، في حين تؤكد نتائج انقسام البويضات والتي جاءت غير معنوية لجميع الفئات العمرية للنعاج في الفصول المختلفة إلى اكتساب البويضات للقدرة التطورية التي تمكنها من متابعة واستئناف الانقسامات الخلوية في فصول السنة والفئات العمرية كافة **(العبيدي، 1989)**.

أشارت نتائج الدراسة (الجدول 5) إلى وجود فرق معنوي($P < 0.01$) في معدل الإنضاج (43.52% ، و48.29% ، و56.87% ، و57.98%) والإخصاب (16.03% ، و26.43% ، و37.91% ، و34.18%) لبويضات النعاج وغير معنوي في معدل انقسام البويضات (0، و32.60% ، و36.25% ، و32.83%) في فصول السنة الشتاء، والربيع، والصيف، والخريف، على التوالي. وعلى الرغم من قلة الدراسات المتعلقة بدراسة تأثير فصل السنة في إنضاج وإخصاب بويضات الأغنام مخبرياً، فإن نتائج الدراسة تتوافق مع نتائج **الطائي (2003)** الذي لاحظ وجود فرق معنوي ($P<0.01$) في نسب الإنضاج والإخصاب المخبري في فصول السنة المختلفة وعدم وجود فرق معنوي في الانقسام المخبري للبويضات المخصبة. سجلت أفضل واقل معدلات إنضاج مخبري لبويضات نعاج العواس في فصلي الخريف والشتاء على التوالي. وهذا لا يتوافق مع ما أشار إليه **الطائي (2003)** الذي حصل على أفضل وأسوأ معدلات إنضاج، وإخصاب، وانقسام مخبري لبويضات الماعز في فصلي الخريف والشتاء على التوالي، على أية حال كانت معدلات إنضاج بويضات نعاج العواس وإخصابها مخبرياً اقل من نظيراتها التي حصل عليها **الطائي (2003)** في الماعز.

ولم تتوافق النتائج الحالية أيضاً مع نتائج **Al-Katanin وزملاؤه (2002)** الذين أشاروا إلى ان القدرة التطورية لبويضات أبقار الهولشتاين خلال الموسم البارد مشابهة لتطورها خلال الموسم الحار، ومع **Rivera وزملاؤه (2001)** الذين لم يلاحظوا وجود تأثير للموسم في دراستهم في إنضاج بويضات الأبقار مخبرياً، واقترح **Al-Katanin وزملاؤه (2002)** أن الآلية الخلوية الخاصة بإنضاج البويضات والإخصاب لا تتأثر باختلاف المواسم لكن قابلية الأجنة على التطور تنخفض خلال الموسم الحار، كما جاءت نتائج الدراسة مخالفة لما توصل إليه **Samake وزملاؤه (2000)** الذين لم يلاحظوا وجود تأثير للموسم في قابلية بويضات

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

الماعز لبلوغ الإنضاج المخبري ونجاح الإخصاب مع استمرار انقسام البويضات المخصبة وبلوغ الأجنة إلى مرحلة الكيس الأصلي

كما لم تتوافق النتائج الحالية للإخصاب المخبري مع نتائج **Rocha وزملاؤه (1998)** الذين لم يلاحظوا وجود فرق معنوي لتأثير الموسم في معدلات إخصاب البويضات المجموعة من أبقار البراهما، بينما أشار **Al-Katanin وزملاؤه (2002)** إلى ان الموسم الحار يخفض من قابلية بويضات أبقار الهولشتاين على التطور الجنيني المبكر ضمن الوسط الزرعي بعد الإخصاب ، وعللوا ذلك إلى ان بعض مكونات الجنين تصنع من قبل البويضة وبسبب الإجهاد الحراري تخرب هذه المكونات، ما يعطي الدليل على تأثير الإجهاد الحراري في تغيير محتوى الفوسفولبيدات في البويضات.

بالإضافة إلى تأثير درجات الحرارة فإن الاختلافات في نتائج الإنضاج والإخصاب المخبري بين فصول السنة قد تعود إلى تأثير المرحلة الفيزيولوجية للنعاج التي جمعت منها البويضات وإلى الاختلاف في حجوم الحويصلات المبيضية وأقطار البويضات المأخوذة منها، خاصة وأن المرحلة من الدورة التناسلية التي كانت فيها النعاج قبل ذبحها غير معروفة، كما تلعب التغذية دوراً واضحاً في الحالة الفيزيولوجية للحيوان، ففي فصل الشتاء تكون تغذية الأغنام مقتصرة على ما يقدمه المربي من كميات قليلة ومتدنية من ناحية قيمتها الغذائية ولانعدام العلف الأخضر الذي قد يؤثر في الحالة الفيزيولوجية والصحية للحيوانات، في حين تتغذى الحيوانات بشكل رئيسي خلال فصل الربيع على العلف الأخضر مع إتاحة فترة زمنية أطول للرعي. لقد أشار **O'Callaghan وزملاؤه (2000)** إلى أن التغير في تغذية الحيوان يسبب تغيرات سريعة وآنية في معدل الفعاليات الاستقلالية ولاسيما ما يتعلق بالأنسولين Insulin والغلوكوز Glucose، فالتغير في الأنسولين يؤثر بشكل كبير في تركيز العوامل المشابهة للأنسولين (IGF-I و IGF-II) التي تعد من العوامل الهامة التي تفرزها البويضة وتلعب دوراً هاماً في نمو و نضج البويضات.

إن التفوق ($P < 0.01$) الذي ظهر في معدلات الإنضاج المخبري لبويضات نعاج العواس في المجموعة B خلال فصلي الصيف والخريف (62.83%و72.04%) وفي معدلات الإخصاب المخبري (46.47% و38.80%) مقارنة مع بقية المجموعات خلال فصلي الشتاء والربيع (الجدولان 6 و 7) من المحتمل أن يرجع إلى كون الغالبية العظمى من البويضات قد جمعت خلال الفصل التناسلي من حويصلات أقطارها كبيرة (≤ 3 مم)، وبالتالي امتلاك تلك البويضات لأقطار> 110 مايكرومتر مما اكسبها قدرة اكبر على الإنضاج

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

والإخصاب المخبري. وجد **Rao وزملاؤه (2002)** فرقاً معنوياً في نسب البويضات ذات النوعية الجيدة والتي أحيطت بأكثر من طبقتين من الخلايا الركامية المستحصل عليها من نعاج بعمر > 2 سنة خلال الفصل التناسلي والبويضات المستحصل عليها خارج الفصل التناسلي. أما نتائج الانقسام المخبري للبويضات المخصبة عبر الفصول المختلفة وعند الأعمار المختلفة لنعاج العواس (الجدول 8) فقد جاءت متقاربة من بعضها البعض وتراوحت نسبها بين 27.77% و37.50% دون وجود تأثير معنوي لهذا التداخل. ولعل هذا التقارب الشديد في نسب الانقسام المخبري عبر الفصول والمجموعات العمرية للنعاج يرجع إلى أن جميع البويضات المنقسمة لها نفس القدرة التطورية التي تمكنها من متابعة الانقسامات في المراحل اللاحقة بعد الإخصاب (**Samake وزملاؤه، 2000**).

يستدل من النتائج ان إنضاج بويضات نعاج العواس مخبرياً والتي في عامها الثاني وخلال فصلي الصيف والخريف كان الأفضل مقارنة مع إنضاج البويضات المستحصل عليها من نعاج بعمر اقل من سنة وفي فصلي الشتاء والربيع .

2-تأثير حجم الحويصلة المبيضية وقطر البويضة في معدلات إنضاج وإخصاب وانقسام بويضات نعاج العواس مخبرياً

أشارت نتائج الدراسة الحالية إلى تأثير معنوي لقطر الحويصلة في معدلات إنضاج بويضات نعاج العواس (10.67% ، و28.97% ، و56.25% ، و70.83%) ومعدلات الإخصاب (0، و0، و26.98% ، و61.76%) في المجموعات A، B، C، وD، على التوالي، ولم يكن الفرق معنوياً في معدل الانقسام (0، و0، و29.41 %، و33.33%) (الجدول 9). وقد جاءت نتائج الإنضاج المخبري لبويضات الأغنام متفقه مع ما أورده **DeSmedt وزملاؤه (1994)** إذ كان معدل إنضاج بويضات الحويصلات التي بقطر اقل من 1 مم منخفضة جداً ولم يتجاوز 10.67% . كما جاءت نتائج الدراسة الحالية مماثلة لما توصل إليه **Stubbs وزملاؤه (2007)** و **Howell وزملاؤه (2001)** الذين أشاروا إلى أن بويضات الأغنام تكتسب القدرة التطورية بشكل تدريجي مع استمرار نمو الحويصلة .

يرجع سبب تدني معدل الإنضاج في بويضات نعاج العواس في حويصلات المجموعتين A و B (الجدول 9) إلى عدم قدرة البويضة على استئناف الانقسام الاختزالي وبقاءها عند مرحلة الـ G.V، و ذلك لعجزها في تصنيع البروتينات الضرورية اللازمة لمتابعة التطور، ما أدى إلى بقاء أغلب البويضات ضمن مجموعة A في مرحلة سكون في الوسط الزرعي، أما

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

البويضات المأخوذة من حويصلات أقطارها 1 – <2 مم (مجموعة B) تمكنت من بلوغ الإنضاج المخبري (28.97%) لاحتمال أنها الأكبر قطراً مقارنة مع البويضات الأخرى ضمن المجموعة نفسها مما ساعدها على إتمام التطور أو نتيجة لإحاطتها بعدد اكبر من طبقات الخلايا الركامية مما أدى إلى زيادة الاتصال بينها وبين مكونات الوسط الزرعي المحيط بها **(الطائي، 2003)**. كما أن احتمال عدم توزع الحبيبات القشرية على طول الغشاء البلازمي للبويضة أدى إلى عدم تمكن اغلب البويضات الناضجة من إتمام الإخصاب الخارجي والانقسام **(Patricia وزملاؤه ،2008)**. كما أشار **Taneja وزملاؤه (2000)** إلى وجود عامل مؤثر ضمن السيتوبلاسم في البويضات المأخوذة من الحويصلات الكبيرة قد يحث على القدرة التطورية. أما البويضات في المجموعتين C و D والتي أقطار حويصلاتها 2 –< 3 مم و ≤ 3 مم على التوالي تمكنت من بلوغ الإنضاج المخبري بنسبة 56.25% و70.83% على التوالي بعد مرور 27 ساعة ضمن الوسط الزرعي الخاص بالإنضاج ومن ثم إتمام الإخصاب الخارجي الناجح (26.98%و 61.76%)، وتتابع الانقسامات الجنينية المبكرة بنسب مقبولة ، مما يشير أن بويضات هاتين المجموعتين أتمت طور النمو مع حصول اكتمال للجزيئات المسؤولة عن إنضاج النواة والسيتوبلازم واكتمال تصنيع البروتينات الضرورية التي تحتاجها البويضة أثناء الإنضاج المخبري **(Black وزملاؤه ،2008)**، بالإضافة إلى ذلك فإن نسبتا الانقسام في المجموعتين C و D بلغتا29.41% و 33.33% على التوالي (الجدول9) يرجع إلى أن معظم البويضات كانت أقطارها ≤120 مايكرومتر مما أتاح استئناف الانقسام الاختزالي لهاتين المجموعتين وبنسب مرتفعة بالمقارنة مع المجموعات الأخرى. ان بويضات الأغنام المأخوذة من حويصلات أقطارها ≤ 3 مم تستطيع تصنيع عامل ضروري من الأم Maternal factor لدعم الإنضاج والإخصاب ومتابعة التطور الجنيني المبكر **(Bogliolo وزملاؤه، 1997)**. إن استكمال القدرة التطورية لبويضات نعاج العواس في المجموعات B، وC، و D قد يعود الى اكتسابها التدريجي للنضج النووي ، وتتابع تصنيع البروتينات اللازمة لتطور البويضة **(Ledda وزملاؤه، 1997)**.

جاءت نتائج دراسة تأثير قطر البويضة في قدرة بويضات نعاج العواس على الإنضاج المخبري في المجموعاتA، وB، وC، و D (6.16% ، 37.28% ، 72.30% ، 82.02%) (الجدول10) بفروق معنوية (P<0.01) في حين لم يلحظ تأثير معنوي في معدلات الإخصاب (0، و22.72% ، و38.29% ، و42.46%) والانقسام المخبري (0، و0، و33.33% ، و41.93%)، وانت هذه النتائج متقاربة مع نتائج **Fair وزملاؤه (1995)** الذين حصلوا على معدلات إنضاج مخبري قدرها 21% ، و42% ، و76% ، و81% في بويضات الأبقار وفقاً

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

لأقطارها. وكذلك مع نتائج **Luciana وزملاؤها (2009)** في دراسة أُجريت على بويضات الأغنام قسمت أقطار البويضات فيها الى ثلاث فئات بدأت بأقل من 100 مايكرومتر ثم 100–<110 مايكرومتر و110–120 مايكرومتر وحصلوا على معدلات إنضاج مخبري 10.8% و11.57% و77.98 % على التوالي. وكانت هذه النتائج اقل مما وجده **Otio وزملاؤه (1996)** والذين حصلوا على معدلات إنضاج مخبرية لبويضات الأبقار تراوحت بين 46.9% و 96.4% ومعدلات إخصاب مخبري تراوحت ما بين 45.2% و78.7% من بويضات أقطارها تزايدت بمعدل 5 مايكرومتر عند تقسيمها من <110الى اكبر من 130 مايكرومتر، وأعلى مما وجده **الطائي (2003)** الذي حصل على نسب إنضاج مخبري لبويضات ماعز أقطارها مماثلة لمجموعات هذه الدراسة 10.66% ، 35.71% ، 48.5% ، 74.2%على التوالي .

بين **Pavlok وزملاؤه (1992)** ان البويضات التي أقطارها < 110 مايكرومتر والبويضات المأخوذة من حويصلات أقل من 3 مم لا يكتمل نضجها النووي أو السيتوبلاسمي في وقت الإخصاب المخبري لذلك تكون غير قادرة على التطور بعد الإخصاب. كما أشار **Fair وزملاؤه (1995)** إلى أن البويضات التي أقطارها< 100 مايكرومتر تكون غير قادرة على استنساخ ونقل mRNA أو إنجاز الخطوات الضرورية بعد إتمام نقل الرسائل الخاصة بتصنيع البروتينات والتنشيط الضرورية لتتابع القدرة التطورية والوصول إلى مرحلة الـ M-II.

يتبين من خلال دراسة تأثير قطر البويضة في قابلية البويضات على الإنضاج المخبري التباين في قابلية البويضات على الإنضاج المخبري و ذلك بسبب ان احتياجات البويضة للمواد الغذائية تختلف حسب مرحلة نموها وتطورها، وهذا الأمر يؤمن من خلال الحويصلات المبيضية بينما في الإخصاب الخارجي فإن تحضين البويضات في الأوساط الزرعية يمكن أن يكون له تأثيراً سلبياً بسبب افتقارها النسبي لبعض المكونات الموجودة في السائل الحويصلي(**Suzuki وزملاؤه، 1994)**. يستنتج من النتائج الحالية أن بويضات نعاج العواس التي أقطارها <120 مايكرومتر والبويضات المستحصل عليها من حويصلات مبيضية أقطارها < 3مم أعطت معدلات إنضاج وإخصاب مخبري أعلى مقارنة مع البويضات الأقل قطراً أو البويضات المستحصل عليها من حويصلات مبيضية أقطارها اقل من 3 مم.

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

3-تأثير مستويات هرمون FSH في إنضاج بويضات نعاج العواس، وإخصابها، وانقسامها مخبرياً

يلاحظ من محتويات الجدول (11) أن المعدلات الكلية لإنضاج البويضات وإخصابها وانقسامها مخبرياً حسب تراكيز هرمون FSH بلغت 72.89% ، و42.94% ، و36.69% ، على التوالي، وبينت النتائج أن إضافة هرمون FSH بالتراكيز المذكورة في الجدول (11) إلى الوسط الزرعي TCM-199 أدت إلى زيادة معنوية(P < 0.01) في معدلات الإنضاج المخبري في المجموعات المختلفة رغم تقاربها مع معدلات الإنضاج المخبري في المجموعات الثلاثة الأولى التي تلي مجموعة الشاهد B وC وD والتي تراوحت قيمها بين 65.89–72.96 %، وان ارتفاع المعدلات في المجموعتين E و F (83.56% و83.66%) و تشابه معدلات الإنضاج المخبري في هاتين المجموعتين يمكن ان يكون دليلاً على تماثل تأثير هرمون FSH عند إضافته بالتركيزين 50 و 75 مايكروغرام/مل إلى أوساط الإنضاج، ولقد جاءت معدلات الإنضاج المخبري للبويضات في هذا البحث أعلى من القيم التي حصل عليها **Mogas وزملاؤه (1997a)** عند استخدامهم لمزيج من هرمونات FSH ، وLH، الاستراديول في الوسط الزرعي ، أو الأبحاث التي تضمنت المزيج السابق من الهرمونات مع إضافة 10% FCS (Fetal Calf Serum) (**Pawshe وزملاؤه ،1996**)، كما جاءت النتائج الحالية في الإنضاج المخبري أعلى من النتائج التي حصل عليها **الجميلي (2003)** في الأغنام عند إضافة 1 مايكروغرام/مل FSH و1 مايكروغرام/مل استراديول في الوسط الزرعي TALP والوسط الزرعي TCM-199 وكانت القيم 46.89 %و38.94% على التوالي، بالمقابل جاءت نتائج هذه الدراسة متوافقة مع نتائج **Mogas وزملاؤه (1997b)** على الماعز الذين توصلوا إلى معدلات إنضاج مخبري عالية (70%) عند استخدام مزيج من الهرمونات FSH، وLH، والاستراديول، مع إضافة الـ EGS(Estrous Goat Serum)، و مع نتائج **Totey وزملاؤه (1992)** في الجاموس، و **Kuwer وزملاؤه (1999)** في الأبقار.

حصل **Berlinguer وزملاؤه (2004)** على نسب إنضاج مخبري مرتفعة(90%) مقارنة مع نتائج الدراسة الحالية لبويضات الأغنام عند إضافة 10 مايكروغرام /مل من هرمون FSH في الوسط الزرعي TCM-199، بينما حصل **Sogorescu وزملاؤه (2010)** عند إضافة 50 مايكروغرام /مل من هرمون FSH في الأوساط الزرعية لبويضات الأغنام إلى نسب إنضاج مخبري تراوحت بين 64–72% ، ولم تفلح إضافة مزيج من هرموني FSH وLH (10 مايكروغرام /مل لكل منهما) في رفع معدلات إخصاب وانقسام بويضات الأغنام إلى أكثر من

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

10% رغم ارتفاع معدل الإنضاج المخبري لتلك البويضات مقارنة مع معدل الإخصاب (57%) بينما كانت نسب البويضات المنقسمة في مرحلة 2–16 خلية 70% والتويتة 14% في الوسط الزرعي TCM-199 و35% و8% على التوالي في الوسط الزرعي TCM المعدّل (**Abdulhadi وزملاؤه ، 2004**).

إن توافق نتائج هذه الدراسة مع الدراسات السابقة المذكورة التي تضمنت إضافة مزيج هرموني يفسر بأن ارتفاع معدلات الإنضاج المخبري عند إضافة تراكيز مرتفعة من هرمون FSH (المجموعتينE وF)، يمكن أن يحدث بالأثر نفسه الناتج عن استخدام هرمون FSH منفرداً عوضاً عن استخدامه مع مزيج من الهرمونات، إذ ان إضافة هرمون FSH لوحده (التراكيز العالية)إلى الأوساط الزرعية المخصصة للإنضاج المخبري لبويضات أغنام العواس كان له نفس التأثير الذي حققته إضافة مزيج من الهرمونات (FSH، وLH ، والاستراديول) عند الأنواع الحيوانية الأخرى.

يمكن ان يرجع سبب الحصول على معدلات إنضاج عالية في هذه الدراسة الى كون هرمون FSH بالأصل من المنظمات الأساسية للإنضاج النووي في بويضات الثدييات، و ان عدم إفرازه قبل التبويض يؤدي إلى إعاقة تكوين عوامل النمو وبالتالي توقف الانقسام الاختزالي (**Moor و Trounson ، 1977**)، كما قد يكون للوسط الزرعي المستخدم في الإنضاج المخبري دوراً في الوصول إلى معدلات إنضاج مخبري عالية أثناء إضافة هرمون FSH. وحصل **Wahidوزملاؤه (1991)** على معدلات إنضاج عالية في بويضات الأغنام عند إضافة مزيج من الهرمونات إلى الوسط الزرعي TCM-199 بدون FCS مقارنة مع الوسط RPMI-1640. بالمقابل جاءت نتائج الإخصاب المخبري منخفضة (الجدول11) وتراوحت بين 41.13–44.38% في التراكيز المختلفة وكانت هذه النتائج مخالفة لما توصل إليه **Ledda وزملاؤه (1997) وSzollosi وزملاؤه (1988)** الذين توصلوا إلى معدلات إخصاب مخبري عالية عند استخدام مزيج من الهرمونات السابقة في أوساط الإنضاج، و أقل مما وجده **Attia (2001)** عند استخدام مزيج من الهرمونات في الوسط الزرعي TCM-199 الذي حصل على معدلات إخصاب مخبري 72% في بويضات الأغنام. كما جاءت نتائج الانقسام المخبري اللاحق للبويضات منخفضة وبدون فرق معنوي بالمقارنة مع الدراسات الأخرى (الجدول11) إذ بلغت أعلى قيمة في المجموعة E (37.35%) لمقارنة مع مجموعة الشاهد A(36.36%) في حين بلغ معدل الانقسام المخبري لدى بويضات الماعز والأغنام التي أنضجت في أوساط زرعية حاوية على مزيج من الهرمونات حوالي 74% (**Attia، 2001**).

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

من جانب آخر فقد أدت إضافة هرمون FSH في الأوساط الزرعية لإنضاج البويضات إلى ارتفاع واضح ($P < 0.01$) في معدلات البويضات المنقسمة في مرحلة (2−16) خلية من خلال علاقة عكسية مع ارتفاع تراكيز هرمون FSH، اذ لوحظ ارتفاع معدلات هذه المرحلة عند المجموعات التي كان مستوى هرمون FSH فيها منخفض التركيز (المجموعات A، وB، وC، وD) وانخفاض تلك المعدلات في المجموعتين E و F على حساب ارتفاع معدلات البويضات المنقسمة في مرحلة التويتة($P < 0.05$) والكيس الأصلي(دون فرق معنوي) لنفس المجموعتين (الجدول12) ما يوحي بالأثر الايجابي لهرمون FSH في التطور الجنيني المخبري لخلايا أجنة الأغنام حتى في التراكيز المنخفضة، وقد أتت نتائج الانقسام المخبري في الدراسة منخفضة بالمقارنة مع نتائج **Morton وزملاؤه (2003)** على الأغنام المعاملة بحاثات القند (قبل الذبح) اذ تفوقت البويضات المعاملة بالتركيزين 20 و60 مايكروغرام/مل على البويضات المعاملة بالتركيز 10 مايكروغرام/مل من هرمون FSH (77.9%و76.7% مقابل 59.7%)، بالمقابل وجد **Iulian وزملاؤه (2010)** فرقاً معنوياً ($P < 0.005$) في معدلات البويضات المنقسمة والتي تجاوزت مرحلة 16 خلية وحتى التويتة، كما لوحظ فرق معنوي ($P < 0.005$) في معدلات البويضات المنقسمة في مرحلة التويتة .

لم تظهر إضافة هرمون FSH بالتراكيز السابقة اتجاهاً مميزاً لوصول الأجنة إلى مرحلة الكيس الأصلي(الجدول12)، على الرغم من التأثير الايجابي لهرمون FSH في التطور الجنيني مما يدل على ضعف الدور النسبي لهذا الهرمون في بويضات الأغنام المنقسمة في المراحل المتأخرة للأجنة كمرحلة الكيس الأصلي بالمقارنة مع السيستامين الذي أبدى تأثيراً واضحاً ($P< 0.05$) في هذه المرحلة الهامة من الانقسام والتطور الجنيني المخبري في بويضات الأغنام (الجدول14). ولقد جاءت هذه النتائج مخالفة للنتائج التي توصل إليها **Morton وزملاؤه (2003)** الذين لاحظوا تفوق في معدلات البويضات في مرحلة الكيس الأصلي عند التركيز 20 مايكروغرام/مل بالمقارنة مع التركيزين 10 و60 مايكروغرام/مل (40.3% بالمقارنة مع 23.9 %و27.4%) دون وجود فرق معنوي . وكذلك مخالفة لنتائج **Schoevers وزملاؤه (2003)** الذين لاحظوا فرق معنوي في ارتفاع معدلات البويضات المنقسمة والواصلة إلى مرحلة الكيس الأصلي عند استخدام تراكيز عالية من هرمون FSH في أوساط الإنضاج.

يستنتج من الدراسة الحالية أن إضافة هرمون الـ FSH منفرداً بتراكيز عالية (50−75 مايكروغرام /مل) في الأوساط الزرعية الخاصة بالإنضاج المخبري أعطى نتائج أفضل من

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

إضافته بمستويات منخفضة (< 50 مايكروغرام/مل) في معدلات الإنضاج، والإخصاب المخبري، والانقسام خاصة في مرحلتي التويتة والكيس الأصلي.

4- تأثير مستويات السيستامين في إنضاج بويضات نعاج العواس، وإخصابها، وانقسامها مخبرياً

أشارت نتائج الدراسة الحالية إلى تأثير إضافة السيستامين معنوياً (0.05>P) في معدل إنضاج بويضات نعاج العواس مخبرياً (65.56% ، و80.57% ، و67.63% ، و61.04%)، وعدم تأثيره معنوياً في معدل الإخصاب (41.77% ، و44.12% ، و44.79% ، و37.50%) في المجموعات A، وB، وC، وD على التوالي، كما لم يكن الفرق معنوياً في معدل الانقسام المخبري (36.36% ، و37.33% ، و36.99% ، و35.09%) (الجدول 13) .

يتضح من النتائج أن إضافة السيستامين بالتراكيز المنخفضة خلال الإنضاج المخبري أعطى نتائج ايجابية ومعنوية (P > 0.05) في نسب الإنضاج المخبري لدى بويضات نعاج العواس مقارنة مع التراكيز المرتفعة (المجموعة D)، إذ أظهرت النتائج ان إضافة السيستامين في الوسط الزرعي TCM-199 بتركيز 100مايكرومولر كان الأمثل (المجموعة B) (الجدول13) و أدى إلى ارتفاع في نسبة البويضات الناضجة بشكل معنوي (80.57%). وهذا يتوافق مع نتائج **Mohammadi-Roushandeh وزملاؤه (2006)** في الفئران، ومع ما ذكره **Balasubramanian و Gyu-Jin (2007)** إذ توصلا إلى فرق معنوي لتأثير السيستامين في معدلات الإنضاج المخبري لبويضات الأبقار عند تركيز 100 مايكرومولر، كذلك توافقت نتائج الدراسة مع نتائج **Luciana وزملاؤها (2009)** الذين حصلوا على معدل إنضاج مخبري لبويضات الأغنام 80% عند إضافة 100 مايكرومولر سيستامين، في حين بين **Gasparrini وزملاؤه (2003)** أن إضافة 50 مايكرومولر من السيستامين أعطت نتائج أفضل في الإنضاج المخبري عند الأبقار بالمقارنة مع التراكيز الأعلى منه. و جاءت نتائج هذه الدراسة مخالفة لنتائج **Gasparrini وزملاؤه (2006)** الذين أكدوا أن إضافة 50 مايكرومولر من السيستامين في الوسط الزرعي TCM-199 اثر معنويا في نسب ومعدلات الإنضاج، والإخصاب، والانقسام حتى مرحلة الكيس الأصلي في البويضات عند الجاموس، كما توصل **Lee (2004)** إلى أن إضافة500 مايكرومولر من السيستامين في الوسط الزرعي TCM-199 أدى إلى زيادة نسبة الإنضاج المخبري حتى 63% لبويضات الإبل وبفروق معنوية عن التركيزين 100 و 200 مايكرومولر. يمكن تفسير الدور الايجابي للسيستامين في الإنضاج

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

المخبري في زيادة تمثيل الغلوتاثيون الذي يلعب دوراً في تقليل الفعل التأكسدي السام في خلايا الأجنة الذي قد يعتبر من أكثر العوامل التي تسبب ضرراً لخلايا الأجنة وتدهورها وموتها في مراحل لاحقة من الإخصاب المخبري (**Karami وزملاؤه، 2009 و De Matos وزملاؤه، 2007**).

وقد يكون الوسط الزرعي TCM-199 المستخدم في الإنضاج المخبري قد يكون له دور هام في إظهار الدور الايجابي للسيستامين في عملية الإنضاج المخبري بالمقارنة مع غيره من الأوساط الزرعية الأخرى. فقد بين **Mohammadi-Roushandeh وزملاؤه (2006)** أن إضافة السيستامين بالتراكيز المختلفة إلى الوسط الزرعي TCM-199 كان الأفضل من حيث نسب الإنضاج المخبري بالمقارنة مع الوسط الزرعي MEME لدى بويضات الفئران وذلك بسبب احتواء الوسط الأخير على نسب عالية من المركبات المعروفة بفقرها للطاقة التي تحتاجها الخلايا الحبيبية (الركامية) أثناء الإنضاج المخبري وهذا ما يفسر ارتفاع نسبة البويضات الناضجة مخبرياً في الوسط TCM-199 مقارنة مع الوسط MEME بوجود السيستامين. لم يجد **De Matos وزملاؤه (2002b)** تأثير معنوي للسيستامين في معدل الإنضاج المخبري لبويضات الأبقار عند إضافته بتركيز 100 مايكرومولر بوجود الـ FCS في الوسط الزرعي.

أما فيما يتعلق بتأثير السيستامين في نتائج الإخصاب والانقسام المخبري لبويضات نعاج العواس فعلى الرغم من عدم وجود فروق معنوية إلا انه لوحظ ارتفاع ظاهري في نسب البويضات المخصبة في المجموعتين A و B (44.12 % و 44.79 %)، وكذلك ارتفاع ظاهري آخر في نسب البويضات المنقسمة في نفس المجموعتين(37.33% و 36.99%) عن بقية المجموعات، ما يوحي بالأثر الايجابي للسيستامين في التطور اللاحق للبويضات في الإخصاب والانقسام المخبري حتى مرحلة الكيس الأصلي.

لوحظ من نتائج الدراسة الحالية وجود فرق معنوي ($P < 0.001$) في نسب البويضات المنقسمة عند استخدام تراكيز مختلفة من السيستامين وخاصة في المجموعتين A و B التي بلغت فيهما نسب البويضات التي وصلت إلى مرحلة الكيس الأصلي 42.86% و 18.52 % على التوالي مع ملاحظة انخفاض نسب البويضات المنقسمة في مرحلة (2–16) خلية في المجموعة A وذلك على حساب ارتفاع نسب البويضات الواصلة إلى مرحلتي التويتة والكيس الأصلي وبلغت القيمة 17.86 % مقارنة مع المجموعتين C و D (70.00 % و 70.83%)، على التوالي.

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

يمكن أن يعزى انخفاض نسب الإنضاج المخبري لبويضات نعاج العواس كذلك انخفاض نسب الأجنة لها في مرحلتي التويتة والكيس الأصلي عند التراكيز المرتفعة من السيستامين (المجموعتين C وD) إلى التأثير السمّي(toxic) للسيستامين عند إضافته إلى أوساط الإنضاج بتراكيز > 100 مايكرومولر رغم الدور الايجابي الحيوي للسيستامين (**Anand وزملاؤه 2008**).

تتفق النتائج الحالية مع ما توصل إليه **Geshi وزملاؤه (1999)** الذين لم يجدوا فروقاً معنويةً للسيستامين في الإخصاب المخبري لبويضات الأبقار عند إضافته بعدة مستويات 0، و0.5، و5، 50، و500 مايكرومولر، كذلك لم يجد **De Matos وزملاؤه (2007)** تأثير معنوي للسيستامين في معدل الإخصاب المخبري لبويضات الأبقار عند إضافته بتركيز 100 مايكرومولر بوجود الـ FCS في الوسط الزرعي، في حين كان هناك فرق معنوي (P<0.01) للسيستامين في معدل الانقسام المخبري للبويضات من جهة وارتفاع معدلات الانقسام في مرحلة الكيس الأصلي من جهة أخرى.

كما جاءت نتائج تطور البويضات بعد الإخصاب في المراحل اللاحقة من الانقسام المخبري عند المجموعتين A و B متوافقة مع نتائج **Grupen وزملاؤه (1995)** الذي وجد فرق معنوي لتأثير السيستامين في التطور الجنيني حتى مرحلة الكيس الأصلي عند إضافة السيستامين بتركيز 500 مايكرومولر في الوسط الزرعي لدى الخنازير.

بينما توصل **Zheng وزملاؤه (1988)** إلى فرق معنوي (P < 0.01)عند إضافة السيستامين إلى الأوساط الزرعية (100 مايكرومولر) في معدلات الأجنة في مرحلة الكيس الأصلي عند الأغنام بالمقارنة مع الأوساط الزرعية الخالية من السيستامين .

يمكن أن يرجع التأثير الايجابي للسيستامين في تطور بويضات نعاج العواس الى وزنه الجزيئي المنخفض وكذلك لدوره في زيادة نسب الغلوتاثيون في السائل الخلوي (**Takahashi وزملاؤه، 1995 : 2002؛ Geshi وزملاؤه، 1999**) و(**Cammano وزملاؤه ،1998**). علماً أن هناك من أشار إلى أن إضافة 100 مايكرومولر من السيستامين إلى أوساط الإنضاج لبويضات الخيول لم تؤد إلى زيادة معنوية في الغلوتاثيون والذي أرجعه إلى تأثير النوع الحيواني المدروس والى الاختلاف في أوساط الإنضاج المستعملة(**Luciano وزملاؤه، 2006**). أكد **Yoshida وزملاؤه (1993)** أن الغلوتاثيون الناتج عن إضافة السيستامين في أوساط الإنضاج يمكن أن يلعب دوراً هاماً في التأثير في حيوية النطاف لان وجود كميات كافية من الغلوتاثيون في السائل الخلوي في البويضات المنضجة له دور في تقليل كثافة الكروماتين عند

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

النطاف(decondensation) المخترقة لأغشية البويضة أثناء الإخصاب، ما ينعكس إيجابا في عملية الإخصاب وبالتالي حصول تزامن امثل مع تنشيط البويضات وتشكيل البداءة النووية الذكرية إلى جانب البداءة النووية الأنثوية.

إن الاختلاف والفروق النسبية الملحوظة في نتائج هذه الدراسة (الجداول 4، و5، و6، و9، و10، و11، 12، و13) وبين ما توصل إليه الباحثون الآخرون بالنسبة لنسب الإنضاج المخبري قد يعزى بالإضافة إلى العوامل السابقة المدروسة أيضا إلى الإضافات المستعملة مع الأوساط الزرعية الخاصة بالإنضاج المخبري من حيث نسبتها ونوعيتها فقد وجد **Samake وزملاؤه (2000)** عند إضافة كل من مصل عجلات الأبقار و هرمون الـ (LH) بكمية 100 مايكروغرام/مل وهرمون الـ FSH بكمية 0.5 مايكروغرام/مل إلى الوسط الزرعي TCM-199 أدى إلى ارتفاع نسبة الإنضاج المخبري إلى 100% ، أما **العبيدي (1989)** فقد حصل عند استخدم FGS بنسبة 10% وهرمون الـ FSH 2.5 مايكروغرام/مل مع 5 وحدات دولية من hCG كإضافات إلى الوسط الزرعي TCM-199 على نسبة إنضاج بلغت 30% ، وكذلك حصل **الأحمد (2002)** على نسبة إنضاج مخبري 41.37% لبويضات الماعز عند إضافة 5 وحدات دولية من hCG إلى الوسط الزرعي TCM-199.

كما اختلفت النتائج الحالية للإنضاج المخبري أيضاً مع نتائج **Yadav وزملاؤه (1998)** إذ كانت نسبة الإنضاج 79.8% مع إضافة مصل الجاموس الشبق Buffalo Estrus Serum (BES) بنسبة 10% ، ومع ما توصل إليه **Rodrigues-Gonzalez وزملاؤه (2001)** الذين حصلوا على نسبة إنضاج قدرها 72.4% عند إضافة مصل العجول بنسبة 10% ، ومع نتائج **Izquierdo وزملاؤه (2002)** بنسبة إنضاج 81.4% و 71.4% لبويضات إناث الماعز البالغة وغير البالغة، على التوالي، أما عند إضافة مصل الماعز الشبق Estrus Goat Serum (EGS) فقد انخفضت النسبة إلى 20%

واختلفت نتائج استخدام الوسط الزرعي TCM-199 لإنضاج بويضات الأغنام في الدراسة الحالية أيضاً مع نتائج **DeSmedt وزملاؤه (1992)** الذين حصلوا على نسبة إنضاج 86% عند إضافة 10% من مصل الأبقار Calf Serum . كذلك مع نتائج **Crozet وزملاؤه (1995)** الذين حصلوا على نسبة إخصاب 97% عند إضافة مصل الأبقار بنسبة 10% .

يستنتج من نتائج الدراسة أن إضافة السيستامين بتركيز 100 مايكرومولر في الوسط الزرعي TCM-199 أدى إلى رفع معدلات الإنضاج، والإخصاب المخبري، و معدل

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

البويضات المنقسمة في مرحلة الكيس الأصلي في أغنام العواس مقارنة مع إضافته بمستويات عالية (200، و400 مايكرومولر).

5-دراسة مراحل تطور النوى لبويضات نعاج العواس خلال فترات الإنضاج المخبري

تتضمن عملية الإنضاج المخبري مرحلتين مرتبطتين مع بعضهما ارتباطاً وثيقاً هما مرحلة الإنضاج السيتوبلاسمي ومرحلة الإنضاج النووي ، فالإنضاج السيتوبلاسمي يُعنى بتهيئة البيئة الداخلية للبويضة لعملية الإخصاب ودخول النطفة، في حين يترافق الإنضاج النووي بمجموعة من التغيرات المتسلسلة والمتتابعة خاصة عندما تكون عندها البويضة متوقفة في مرحلة السكون، وعند توفر الظروف الملائمة تنشط البويضة و يبدأ الغلاف النووي بالزوال بالتحلل (GVBD) و تتكثف الصبغيات وتصل إلى طور الـ M-I، وبعدها إلى طور الـ M-II حيث يتم الإنضاج النووي للبويضة(**Mermillod وزملاؤه، 2006**)

بينت نتائج الدراسة (الجدول15) بأن مراحل تطور النوى تتم خلال 27 ساعة من الإنضاج المخبري و ان نسبة 88.46% من البويضات قبل بدء عملية الإنضاج المخبري أي عند ساعة (صفر) تكون في مرحلة الـ G.V فيما كانت النسبة المتبقية 11.53% في مرحلة الـ GVBD. وهذه النتيجة تشابه تقريباً ما توصل إليه **Leibfried و First** (**1979**) في الأبقار، **والطائي** (**2003**) في الماعز إذ بلغت القيم (مرحلةG.V) 93% ، و90% ، على التوالي قبل بدء الإنضاج. في حين جاءت هذه النتيجة اقل من نظيراتها التي أشار إليها **Xu وزملاءه** (**1986**) والتي أكدت وصول البويضات نضجها المخبري في مرحلة GBVD إلى 95% ، وبالمقابل جاءت نتائج الدراسة أعلى من النسبة التي حصل عليها **Kumar وزملاؤه** (**1997**) في الجاموس والبالغة 83% .

في المرحلة التالية (مرحلة زوال الغلاف النووي GVBD) بلغت البويضات أعلى نسبة لها(53.84%) بعد مرور 6 ساعات من الزرع المخبري ومن ثم انخفضت إلى 12.90% بعد 12 ساعة من الحضن المخبري (الجدول 15). وهذه النتيجة جاءت اقل بالمقارنة مع نتائج **Leibfried و First** (**1979**) الذين لاحظا هذه المرحلة في الأبقار بعد 6 ساعات وبنسبة 65% ، كما كانت نتائج هذه الدراسة اقل من نتائج **Kumar وزملاؤه** (**1997**) إذ بلغت

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

البويضات مرحلة الـ GVBD وبأعلى نسبة لها بعد 6 ساعات (61%) في الجاموس. بينما كانت نتائج الدراسة الحالية متقاربة مع نتائج **الطائي (2003)** الذي أشار بأن 50%من البويضات تصل مرحلة الـ GVBD بعد 6 ساعات في الماعز.

أما مرحلة الـ M-I فيلاحظ استهلالها وبنسبة 16.66% بعد 9 ساعات من الإنضاج المخبري، ثم تصل أعلى نسبة لها(48.14%) بعد مرور 24 ساعة من بدء الإنضاج المخبري للبويضات (الجدول15)، أما **الطائي (2003)** وجد أن بدء تكوين هذه المرحلة كانت بنسبة 13.6% بعد 6 ساعات من مرحلة الإنضاج ووصلت أعلى نسبة لها(47.61%) بعد مرور 24 ساعة من بدء الإنضاج المخبري لبويضات الماعز، ولاحظ **Leibfried و First (1979)** ان ظهور طور الـ M-I كان بنسبة 25% بعد مضي 12 ساعة من الإنضاج المخبري للبويضات. في حين جاءت النتائج الحالية اقل مما وجده **Kumar وزملاؤه (1997)** الذين أشاروا إلى أن 31.8% من البويضات تصل لمرحلة الـ M-I بعد مرور 12 ساعة من الإنضاج المخبري .

ولقد لوحظ إنهاء البويضات مرحلة الـ M-I وبلوغها مرحلة الـ M-II بعد 21 ساعة بنسبة 12.50% لتصل إلى 71.42% في نهاية مرحلة الإنضاج المخبري (27 ساعة) (الجدول 15) وهذا لا يتوافق مع **Xu وزملاؤه (1986)** الذين لاحظوا ان بلوغ بويضات الأبقار طور الـ M-II بعد مرور 24 ساعة وبنسبة 79% ، كما كانت النتائج الحالية مخالفة لنتائج **Kumar وزملاؤه (1997)** و ان أعلى نسبة(78.5%) لبلوغ البويضات إلى طور الـ M-II كان بعد مرور 30 ساعة من الإنضاج المخبري.

بينما جاءت النتائج الحالية متقاربة مع نتائج **الطائي (2003)** التي أشارت إلى أن اكتمال إنضاج البويضات وبلوغها مرحلة الـ M-II كان بعد 21 ساعة من الزرع وبنسبة 11.76% بعد مرور 21 ساعة من الزرع المخبري وارتفعت لتصل 74.80% بعد مرور 27 ساعة من الحضن المخبري.

يتضح من نتائج الدراسة الحالية أن الفترة اللازمة لاكتمال إنضاج بويضات نعاج العواس مخبرياً كانت بحدود 27 ساعة فقد ارتفعت نسبة البويضات التي أتمت إنضاجها المخبري، ما يتيح المجال للحصول على نسب إنضاج مخبري عالية.

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

6–تأثير موانع التجمد في حيوية أجنة أغنام العواس المنتجة مخبرياً بطريقة التجميد السريع (التزجيج)

أشارت نتائج الدراسة (الجدول16) إلى تأثير أوساط التجميد A (DMSO)، وB (EG)، وC (DMSO+EG) معنوياً (P<0.01) في معدلات بقاء الأجنة عند إذابتها بعد 72 ساعة من التجميد، إذ بلغت هذه المعدلات 44.11% و42.42% و76.1% ، على التوالي.

جاءت نتائج تجارب التجميد لتتوافق مع العديد من الدراسات التي أكدت إمكانية تجميد أجنة الفئران(**Ishimori وزملاؤه، 1992**)، والأرانب (**Kobayashi وزملاؤه، 1990**)، والأغنام(**Schiewer وزملاؤه، 1990**)، والأبقار(**Dinnyes وزملاؤه، 1994**) باستخدام موانع تجميد مختلفة بطريقة التزجيج.

ولكن كانت نسب بقاء الأجنة في هذه الدراسة اقل من المعدلات التي حصل عليها **Jaroslava وزملاؤه (2010)** لدى الأبقار والتي تراوحت قيمها بين 76–93% ، مع الإشارة إلى أن دراستهم لم تتضمن الأجنة في مرحلة2– 16 خلية. كما جاءت النتائج الحالية اقل مما وجده **Donnay وزملاؤه (1998)** عند استخدامهم لوسط التجميد المؤلف من 25% غليسرول، و25% EG ووصلت القيمة إلى 67% عند إذابتها بعد 72 ساعة من التجميد. كذلك جاءت النتائج الحالية اقل مما وجده **Kaidi وزملاؤه (2001)** والذين حصلوا على معدل بقاء أجنة قدره 80% . بينما توافقت النتائج الحالية مع نتائج **Dattena وزملاؤه (2004)**، و**Isachenko وزملاؤه (2003)**، و **Papadopoulos وزملاؤه (2005)** عند استخدامهم تركيزين متساويين من DMSO و EG بنسبة 1:1 (20%) و حصلوا على معدلات بقاء أجنة مرتفعة في الأغنام.

حصل **Mamoudzadeh وزملاؤه (1995)** على معدلات بقاء عالية عند استخدامه للـ EG بنسبة 40% ، وأشار **Shojro وزملاؤه (2005)** إلى أن إضافة 20% غليسرول و20% EG و0.3 M سكروز في الـ PBS أعطى نتائج أفضل من استخدام 20% EG و 20% DMSO في الوسط الزرعي TCM-199، بينما حصل **Tan (2004)** على معدل بقاء أجنة 100% عند استخدام 15% EG و15% بروبانيول في الأبقار.

من خلال ملاحظة نتائج تأثير أوساط التجميد في قدرة الأجنة المجمدة على البقاء ومتابعة تطورها وانقسامها اللاحق مخبرياً عند الإذابة يمكن الاستنتاج بأن الاختلافات في نتائج

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

التجميد حسب الأوساط السابقة تعود الى تأثير نوع مانع التجمد المستخدم في عملية التجميد (**Saha** و **Suzuki**، **1997**) وطريقة إضافته (منفرداً أو متشاركاً)، والى التأثير التضامني لموانع التجمد .

يمكن أن تعزى الاختلافات في نتائج التجميد حسب الأوساط السابقة أيضاً إلى المرحلة العمرية للجنين المجمد والى محتوى الأجنة من الليبيدات. فقد لاحظ **Dobrinsky وزملاؤه (1999)** فرقاً معنوياً (P< 0.01) في معدلات البقاء لدى الأجنة في مراحلها العمرية المختلفة ومحتواها من الليبيدات، حيث ارتفعت تلك المعدلات في الأجنة التي في مرحلتي التويتة والكيس الأصلي والتي تتميز عادة بانخفاض في مستوى الليبيدات في خلاياها .

كما يؤثر في معدلات بقاء الأجنة إلى طول فترة تعرض الأجنة إلى محلول الموازنة ومحلول التجمد قبل تغطيسها في السائل الآزوتي (**Vajta وKuwayama، 2006**). حصل **Gibbon وزملاؤه (2010)** على معدلات بقاء للأجنة في مرحلتي التويتة والكيس الأصلي وصلت في أجنة الماعز 41% و50% ، على التوالي، و في أجنة الأغنام 64% و64% ، على التوالي عند تعريض الأجنة لمدة 5 دقائق في محلول الموازنة و30 ثانية في محلول التجميد قبل التغطيس في الآزوت السائل.

لقد جاءت معدلات بقاء الأجنة في مرحلة(2−16) خلية في دراستنا منخفضة مقارنة مع معدلات البقاء للأجنة في مرحلة التويتة والكيس الأصلي من ناحية وانخفاض معدلات البقاء لدى الأجنة في مرحلة التويتة بالمقارنة مع الأجنة في مرحلة الكيس الأصلي من ناحية أخرى، ويمكن أن يرجع ذلك إلى الاختلاف في حجم الخلايا الجنينية في المراحل المختلفة من تطور الجنين حتى مرحلة الكيس الأصلي. فقد لاحظ **Tachikawa وزملاؤه (1993)** ان كبر حجم الخلايا في الأجنة المبكرة (2−16) خلية يجعلها أكثر حساسية لاجهادات الضغط الاسموزي وسمية موانع التجمد أثناء اختراقها لخلايا الأجنة على عكس الأجنة في مرحلتي التويتة والكيس الأصلي التي تمتاز بصغر حجم خلاياها بالمقارنة مع الأجنة في مرحلة (2−16) خلية، والى صغر حجم الخلايا نسبياً في مرحلة التويتة بالمقارنة مع حجم الخلايا في مرحلة الكيس الأصلي، ما يجعل خلايا الأجنة في مرحلة التويتة أكثر حساسية للعوامل السابقة من الخلايا في مرحلة الكيس الأصلي، وبالتالي الحصول على معدلات بقاء عالية في مرحلة الكيس الأصلي مقارنة مع نظيراتها في المراحل المبكرة من تطور الأجنة. كما أن للتفاعلات الايضية في الخلايا الجنينية المتنوعة، والزيادة في نشاط Na/K ATPase والذي يحدث خلال تشكل التجويف العصيفي في النسيج الخلوي للطبقة المغذية (Trophoblast) دوراً في

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

زيادة معدل انتقال موانع التجمد إلى داخل الخلايا (**Naitana وزملاؤه، 1996**). إن قلة الدراسات حول تجميد الأجنة في المراحل المبكرة قبل مرحلة التويتة وابتعاد العديد من الباحثين عن تجميد الأجنة في مرحلة (2–16) خلية، يرجع إلى الانخفاض في معدلات البقاء في هذه الأجنة والعائد إلى انخفاض مقاومة الأغشية الخلوية لدى تلك الأجنة لانخفاض الحرارة، ما يؤدي إلى ارتفاع نسب فشل الانزراع (الانغراس) الجنيني في جدار الرحم و انخفاض في معدلات الحمل أثناء زرع الأجنة في هذه المرحلة من العمر بالمقارنة مع النسب العالية لمعدلات الحمل التي حققتها الأجنة المذابة المزروعة في مرحلة التويتة والكيس الأصلي خاصة بعد تشكيل التجويف العصيفي (blastocoelic cavity) في الأجنة في مرحلة الكيس الأصلي (**De Paz وزملاؤه ،1994**)، بالمقابل جاءت نتائج دراسة تأثير أوساط التجميد في القدرة الحيوية للأجنة في المرحلة (2–16) خلية في الأوساط الثلاثة A، وB، وC (30.76% ، و36.36% ، و50%) أعلى مما توصل إليه **Martínez وزملاؤه (2006)** الذين لم تتجاوز معدلات البقاء عندهم أكثر من 10% في هذه المرحلة، كذلك جاءت النتائج الحالية أعلى من النتائج التي حصل عليها **Han وزملاؤه (2000)**.

يلاحظ من نتائج الجدول(16) تفوق الأجنة المجمدة(P<0.01) في الوسط C (DMSO+EG) في معدلات البقاء في مرحلة التويتة والكيس الأصلي (90% و92.85%) على نظيراتها في الوسطين A(DMSO) (44.44% و58.33%)، وB (EG) (40.00% و50.00%)، ما يشير إلى أن استخدام نوعين من موانع التجمد في تجميد الأجنة يساهم في تحسين معدلات بقاء الأجنة في مراحلها المختلفة بالمقارنة مع استخدام نوع واحد وذلك نتيجة التأثير التضامني لموانع التجمد في تقليل سميتّها على الأجنة المجمدة، وقد جاءت نتائج معدلات بقاء الأجنة في مرحلة التويتة والكيس الأصلي في الوسط A (DMSO) منفرداً اقل مما حصل عليه **Bagis وزملاؤه (2005)** لنفس الوسط والبالغان 79% ، و43% ، على التوالي، كذلك جاءت نتائج بقاء الأجنة في مرحلة التويتة في الوسط B (EG) اقل مما حصل عليه نفس الباحثان لنفس الوسط (69% و52%).

بينما وجد **Shirazi وزملاؤه (2010)** فرق معنوي (P<0.01) في معدلات بقاء الأجنة في مرحلة التويتة والكيس الأصلي بالمقارنة مع معدلات بقاء الأجنة في مرحلة (2–16) خلايا عند تجميد الأجنة في مراحل مختلفة في وسطين تضمن الوسط الأول 3.4 M غليسيرول و 4.8 M EG، بينما تضمن الوسط الثاني 2.7 M غليسيرول، و3.4 M DMSO .

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

يستنتج من الدراسة الحالية أن استخدام مزيج من موانع التجمد(DMSO و EG) في تقانة التجميد بالتزجيج أعطى معدلات بقاء للأجنة أعلى من الـ DMSO أو الـEG منفردين، ما يشير إلى أن أجنة نعاج العواس المنتجة مخبرياً تستطيع أن تبقى حية بصورة اكبر عند استخدام مزيج متماثل من DMSO وEG كمانع تجمد بهذه الطريقة.

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

الفصل الخامس

الاستنتاجات والمقترحات

Conclusions And Recommendations

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

الاستنتاجات

- يمكن الاعتماد على المسالخ كمصدر منخفض الكلفة في برامج إنتاج أجنة الأغنام مخبرياً في مراحلها العمرية المختلفة خلال فصلي الصيف والخريف.
- أظهرت نتائج الدراسة أن بويضات نعاج العواس المأخوذة من حويصلات بقطر>3 مم والبويضات ذات أقطار > 120 مايكرومتر كانت الأفضل في برامج إنتاج الأجنة مقارنة بالحويصلات والبويضات الأقل قطراً.
- أدت إضافة هرمون FSH في برامج إنتاج الأجنة إلى ارتفاع ملحوظ في معدلات البويضات الناضجة خاصة في التراكيز المرتفعة مع تفاوت في نسب إخصاب البويضات وانقسامها.
- بينت نتائج الدراسة أن إضافة السيستامين بالتراكيز المنخفضة (100 مايكرومولر) في برامج إنتاج الأجنة سببّ ارتفاعاً ملحوظاً في معدلات البويضات الناضجة و تفاوتاً في نسب الإخصاب والانقسام المخبري مع ارتفاع نسب البويضات المنقسمة في مرحلتي الموريولا والكيس الأصلي.
- أظهرت نتائج الدراسة أن الوقت اللازم لاكتمال الإنضاج النووي في بويضات الأغنام مخبرياً يتم بعد مرور 27 ساعة من الحضن المخبري .
- أدى استخدام مزيج من موانع التجميد DMSO و EG بنسب متساوية عند التجميد بطريقة التزجيج إلى ارتفاع معدلات الحيوية لأجنة الأغنام في كافة مراحلها العمرية بعد الإذابة

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

المقترحات

- ضرورة متابعة الدراسات باستعمال أوساط زرعية وأوساط زرعية داعمة وتقانات خاصة لرفع نسبة إنضاج وإخصاب البويضات التي بقطر <120 مايكرومتر وبويضات الحويصلات ذات القطر <3 مم بغية حث هذه البويضات على متابعة تطورها مخبرياً.
- إجراء المزيد من الدراسات لرفع نسبة إنضاج وإخصاب وانقسام البويضات خلال فصلي الشتاء والربيع.
- الاستمرار في الأبحاث العلمية الخاصة برفع معدلات إنضاج وإخصاب وانقسام البويضات عند النعاج صغيرة العمر.
- الاستمرار في إجراء الدراسات العملية على استخدام تراكيز مختلفة من الهرمونات المحفزة ومضادات الأكسدة كإضافات في الأوساط الزرعية المستخدمة لزيادة معدل الإنضاج والإخصاب المخبري وإيضاح آلية تأثير هذه الهرمونات والمضادات خاصة في بويضات الحيوانات موسمية التناسل كالأغنام والماعز.
- ضرورة الاستمرار في الدراسات الخاصة بتحديد الفواصل الزمنية لمراحل تطور النوى خلال فترة الإخصاب والانقسام المخبري.
- التوسع في استخدام تقانة إنتاج الأجنة وحفظها مخبرياً بطرق التجميد المختلفة ذات الكلفة المنخفضة لتشمل كافة أنواع الحيوانات الزراعية وإنشاء بنوك وراثية للحفاظ على العوامل الوراثية للسلالات المحلية المتميزة .

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

الفصل السادس

المراجع

References

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

المراجع العربية:

الأحمد ، حازم إسماعيل عبد الباري . (2002) . استخدامات هرمونية مبرمجة لتوحيد الشبق ، فرط الاباضة ، جمع البويضات والأجنة ، التخصيب خارج الرحم لدى المعز المحلي. رسالة ماجستير – كلية الطب البيطري – جامعة بغداد .

جلبي ، صلاح مهدي محسن . (2003). التأثير الفسيولوجي للهرمونات الموجهة للقند في استحداث إفراط الاباضة وإنضاج البويضات وإخصابها خارج الجسم في الفئران. رسالة ماجستير – كلية العلوم – جامعة بغداد–العراق.

الجميلي، محمد طه. (2003).الإخصاب الخارجي في الأغنام وبعض العوامل المؤثرة عليه، رسالة ماجستير– كلية الزراعة – جامعة الانبار– العراق.

درويش، عبد الرحمن. (2009) . إستقلاب الليبيد و حفظ الأجنة عند الأبقار . رسالة دكتوراه– جامعة فرانسواه رابليه –فرنسا (ملخص عربي).

زكريا عبد الحميد وسلهب ،سليمان (1991) .فيزيولوجيا التناسل والتلقيح – الجزء النظري. كلية الزراعة– جامعة دمشق – مطبعة جامعة دمشق– سوريا

سامرائي ، محمد طارق عبدالله . (2002). إنتاج أجنة الأبقار مختبرياً وبعض العوامل المؤثرة عليها . رسالة ماجستير – كلية الزراعة – جامعة بغداد –العراق.

الطائي، محمد عبد الكريم .(2003) . إنضاج وإخصاب بويضات الماعز مختبرياً لنماذج مأخوذة من المجازر وبعض العوامل المؤثرة بها .رسالة ماجستير . كلية الزراعة ، جامعة بغداد– العراق .

طليمات ، فرحان . (1996) . موسوعة عروق الأغنام العربية، مشروع التنوع الحيوي في الدول العربية – المركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة (أكساد–دمشق)

عبيدي ، غسان حسين جعفر . (1989) . الإخصاب الخارجي في الأغنام ، رسالة ماجستير . كلية الطب البيطري ، جامعة بغداد– العراق .

فهيم هاني نبيل 2007، بعض الدراسات الفسيولوجية والغذائية على الأرانب–رسالة دكتوراه–كلية الزراعة– جامعة المنصورة –مصر.

المجموعة الإحصائية السنوية. (2008). مديرية الإحصاء والتخطيط، وزارة الزراعة و الإصلاح الزراعي.

مرستاني ربيع، محمد و زرقاوي، معتز . (2001).الكفاءة التناسلية للأغنام العواسي – مداولات ورشة عمل تحسين الأغنام العواس بالانتخاب في القطر العربي السوري – المركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة (أكساد – دمشق) ث ح/ن 2001/252 :149–159.

المزيد محي 1986. فيسيولوجيا التناسل والتلقيح الاصطناعي– الجزء النظري. كلية الزراعة – جامعة

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

حلب – مطبعة جامعة حلب– سوريا.

المراجع الأجنبية:

Abdulhadi , A.A. ,and Ahmed ,R. A.(2004). In vitro Maturation(IVM) and Fertilization (IVF) of Sheep Ova Cultured in Two Different Media. J.King Saud Univ., Vol. 16,*Agric. Sci*. (1), pp. 15-24, Riyadh (1424).

Abe, H.; Hoshi, H. (2003). Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. *J. Reprod. Fertil*. 49, 193-202

Accardo, C; Datten, M; Pilichi, S; Mara, L; Chessa, B. and Cappai, P.(2004). Effect of recombinant human FSH and LH on in vitro maturation of sheep oocytes; embryo development and viability. *Animal Reproduction Science*, 81: 77–86.

Ali, A. A.; Bilodeau J. F. and Sirard M. A.(2003). Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. *Theriogenology* 59(3-4):939-949.

AL-Katanani, Y.M ; Paula-Lopes , F.F. and Hansen , P.J. (2002) . Effect of season and exposure to heat stress on Oocyte competence in Holstein Cows . *J. dairy Sci*. 85: 390 -396.

Allen , R.L. ; Bondioli , K.R. and Wright , R.W. (1982) . The ability of fetal calf serum . new-born calf serum and normal steer serum to promote the in vitro development of bovine morula . *Theriogenology* . 18 : 185 - 189.

Anand, T.; Kumar, D. K.; Chauhan, M. S.; ManikA R. S. and Palta, P.(2008). Cysteamine supplementation of *in vitro* maturation medium,*in vitro* culture medium or both media promotes in vitro developement of buffalo(bubalus bubalis) embryos.*reprod*.20:253-257

Apa , R. ; Lazone , A. ; Miceli , F. ; Mastrandrea , M. ; Caruso , A. ; Mancuso , S. and Canipari , R. (1995) . Growth hormone-releasing factor stimulates meiotic maturation in follicle and cumulus - enclosed rat oocyte . *Mol* . *Cell* . *Endocr* . 112 : 195 -201. (Abstr.) .

Arlotto, T.; Schwartz, J. L; First, N. L. and Leibfried-Rutledge, M. L.(1996). Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology*, 45:943-956.

Ashmore, S.E. (1997). Status report and development and application of in vitro techniques for the conservation of plant genetic resources. *International Plant Genetic Resources*, Rome, Italy.

Attia, K.H.E. (2001). Studies on in vitro fertilization of small ruminant oocytes. Ph. D. Thesis, Department of Theriogenology, Faculty of

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

Veterinary Medicine, Cairo University, Egypt

Austin, C. R. and Short , R.V. (1982) . Germ cell and fertilization . In . Reproduction In Mammals . 2nd ed. University press , Cambridge

Avery . B. ; Hay - Schmidt , A. ; Hyttel , P. and Greve ,T. (1998) .Embryo development , Oocyte . morphology and Kinetics of meiotic maturation in bovine oocytes exposed to 6- Dimethyalmino Purine prior of in vitro maturation . *Mol* . *Reprod* . Dev. 50 : 334 - 344.

Ayalon , D. ; Tsafriri , A.; Lindner ; H.R. ; Cordova , T. and Harell , A. (1972) . Serum Gonadotropin levels in pro - oestrus rats in relation to the resumption of meiosis by the oocytes . *J. Reprod* . *Fert* . 31 : 51-58.

Badinga, L. ; Thatcher , W.W. ; Diaz , T. ; Drost , M. and Wolfenson , D. (1993) . Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein Cows . *Theriogenology* . 39 : 797 - 810 . (Abstr .).

Bagis, H.; Mercan, H.O.; Cetin, S. and Sekmen, S.(2005). The effect of equilibration time on survival and development rates of mouse pronuclear-stage embryos vitrified in solid surface (SSV) and conventional straws: In vitro and in vivo evaluations. *Mol Reprod Develop*;72:494-501

Baird , D.T. ; Swanston , I. And Scaramuzzi ,R.J. (1976) . Pulsatile relase of LH and secretion of ovarian steroids in sheep during the luteal phase of the estrus cycle . *Endocr* : 98 : 1490-1496.

Balasubramanian, S. A. and Gyu-Jin Rhob. (2007). Effect of cysteamine supplementation of in vitro matured bovine oocytes on chilling sensitivity and development of embryos. *Animal Reproduction Science* 98 282–292

Baldassare , H. ; Wang , B. ; Kafidi , N. ; Keefer , C. ; Lazaris , A. and Karatzas ; C.N. (2002) . Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production technologies .*Theriogenology* . 57 : 275-284.

Bank, H. and Maurer, R.R. (1974): Survival of frozen rabbit embryos. *Exp. Cell Res*., 89, 188-196.

Bar - Ami , S.and Tsafriri , A. (1981) . The acquisition of meiotic competence in the rat : role of Gonadotropin and estrogen . *Gamete Res*. 4: 463-472.

Barnes , F. L. ; Looney , C. R. and Westhusin , M.E. (1991) . Embryo cloning in cattle : The current state of technology . *Embryo Transfer Newsletter* . 6 : 1-6. (Abstr.).

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

Beavers, M.M. and Izadyar, F.(2002).Role of growth hormone and growth hormone receptor in Oocyte maturation. Mol. Cell. Endocrinol. 197, 173–178 .

Behi , R. and Pandey , R.S. (2001) . Effect of epidermal growth factor on steroidogenesis by caprine granulosa cell in culture : interaction with FSH . *Small Rumin. Res*. 40 : 57-62.

Beker, A. R.C.L; Colenbrander, B. and Bevers, M.M. (2000). Effect of 17ß-estradiol on the in vitro maturation of bovine oocytes. *Small Rumin. Res*. 38 : 43-52.

Berlinguer , F. ; Leoni , G. ; Bogliolo , L. ; Pintus , P .P. ; Rosati , I. and Ledda , S,et al.(2004). FSH different regimes affect the developmental capacity and cry tolerance of embryos derived from oocytes collected by ovum pick-up in donor sheep. *Theriogenology* .61:1477– 86.

Betteridge , K.J. ; Smith ,C. ; Stubbings , R.B. ; Xu , K.P. and King , W.A. (1989) . Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocyte in vitro . *J. Rrpord. Fertil* . 38 : 87-98.

Bilton, R.J., and R.W. Moore. 1976. In vitro culture, storage, and transfer of goat embryos. *Aust. J. Biol. Sci*. 29:125-129.

Black, L.D.; Allen, P. G.; Morris, S.M.; Stone P.J.and Suki, B., (2008). Mechanical and failure properties of extracellular matrix sheets as a function of structural protein composition. *Biophys*. J. 94, 1916-1929.

Blondin , P. ; Sirard , M.A. (1994) . The influence of oocyte and follicular morphology on developmental competence in super ovulation heifers . Theriogenology . 41 : 161 (Abstr.).

Bogliolo, L.; Leoni, G.; Deledda F.; Ledda, S. and Naitana, S., (1997). Maturation romoting activity of invitro matured adult and prepubertal ovineoocytes, Proceedings of the l3th *Scientific Meeting*, AETE, 132.

Bondioli , K.R. and Wright , R.W. (1983) . In vitro fertilization of ovulated and ovarin ovine oocyte . *J. Anim . Sci*. 57(4) : 1006-1012.

Brackett ,B.G. ; Oh , Y.K. ; Evans , J. F. and Donawick , W.J. (1980) . Fertilization and early development of cow oocyte . *Biol. Repord* . 23 : 189-205.

Caamano, J.N., Ryoo, Z.Y. and Youngs, C.R. (1998) Promotion of development of b ovine embryos produced in vitro by addition of cysteine an B—mercaptoethanol to a chemically defined culture system. *J. Dairy Sci*., 81. 369-374.

Camargo, LSA.; Sá, WF.; Ferreira, A.M.; Viana, H.M. and Araujo MCC. (2002). Taurina no desenvolvimento de embriões bovinos

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

fecundados in vitro.*Arq Bras Med Vet Zoot*, 54:396-404.

Cetica, P. D.; Pintos, L. N.; Dalvit, G. C. and Beconi M. T. (2001). Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte in vitro maturation. *IUBMB Life* 51(1):57-64.

Chance, B.; Sies, H. and Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews* 59 527–605

Chen, N.; Swee-Lian, L.;Wan-Yue, Y.;Lay-Geok, T. and Soon-Chye, N.(2005). Influence of cysteamine supplementation and culture in portable dry-incubator on the in vitro maturation, fertilization and subsequent development of mouse oocytes. *Theriogenology* 63 2300–2310.

Chen , L. ; Russell , P.T. and Larsen , W.J. (1993) . Functional significance of cumulus expansion in the mouse : roles for the pre Ovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass . *Mol , Repord . Dev*. 34 : 87-93. (Abstr.).

Cheng , W.T.K. ; Moor , R.M. and Polge , C. (1986) . In vitro fertilization of pig and sheep oocyte matured in vivo and in vitro . *Theriogenology* . 25 : 146-149.

Chouinard , L.A. (1971) . Alight - and electron -Microscope of the nucleolus during growth of the oocyte in the prepuberal mouse . *J. Cell . Sci*. 9 : 637-663.

Cognie , Y. ; Baril , G. ; Poulin , P. and Mermilod , P. (2003) . Current status of embryo technologies In sheep and goat . *Theriogenology* 62 : 1182-1191 .

Cognie , Y. ; Benoit , F. ; Khatir , H. and Driancourt , M.A. (1998) . Effect of follicle size and of the FecB Booroola gene on oocyte function in sheep . *J. Repord . Ferti* . 112 : 379-386.

Cognie , Y. ; Poulin , N. ; Pignon , P. Suion , J. ; Beckers , J.F. ; and Guerin , Y. (1995) . Does heparin affect development ability of IVF goat oocyts 11th meeting of the European Embryo Transfer Association , Hannover, Germany .

Comizzoli , P.; Urner, F.; Sakkas, D. and Renard J. P. (2003). Up-regulation of glucose metabolism during male pronucleus formation determines the early onset of the s phase in bovine zygotes. *Biol Reprod* 68(5):1934-1940.

Cox , J.F. ;Avila , J. Saravia , F. and Santa Maria , A. (1994) . Assessment of fertilizing ability of goat spermatozoa by in vitro fertilization of cattle and sheep intact oocytes . *Theriogenology* . 41 : 1621-1629.

Cran , D. G. (1989). Cortical granules during oocyte maturation and fertilization. *J Reprod Fertil Suppl* 38:49-62.

Crosby , I.M. ; Osborn ,J. and Candmoor , R.M. (1981) . Follicle cell regulation of protein synthesis and development competence in

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

sheep oocyte : *J. Repord , Fertil* . 62 : 575-582.

Crozet , N. ; Dahirel , M. and Gall , L. (2000). Meiotic competence of in vitro grown goat oocytes. *J. Reprod. Fertil*. , 118 : 367-373.

Crozet , N. ; Ahmed - Ali , M. and Dubos , M.P. (1995) . Development competence of goat Oocyte from follicles of different size categories following maturation , fertilization and culture . In vitro . *J. Repord . fertil* . 103 : 293-298.

Crozet , N. (1984) . Ultra structural aspects of in vivo fertilization in the cow . *Game . Res*. 10 : 241-251.

Dale , B. and Elder , K. (1997) . In vitro Fertilization (ed.) Cambridge University press . Cambridge. U.K.

Dattena, M., C. Accardo, S. Pilichi, V. Isachenko, L. Mara, B. Chessa, and P. Cappai.(2004). Comparison of different vitrification protocols on viability after transfer of ovine blastocysts in vitro produced and in vivo derived. *Theriogenology*, 62:481-493.

De Matos , D.G. and Furnus , C.C.(2007). The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development: Effect of β – mercaptoethanol,cystein and cystin. *Theriogenology* . 53: 761- 771.

De Matos , D.G.; Nogueira , D.R.; Cortvrinda , C. ; Herrera , T. ;Adriaenssens, R.S. and Pasqualini, J.(2003). Capacity of adult and prepubertal mouse oocytes to undergo embryo development in the presence of cysteamine. *Mol Reprod and Develop*; 64: 214–218.

De Matos , D .G. ; Gasparrini, B. ; Pasqualini, S.R. and Thompson, J.G.(2002b). Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology* 57: 1443–1451.

De Matos, D. G, Gasparrini, B.; Pasqualini, S. R. and Thompson J. G. (2002a). Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology* 57(5):1443-1451.

De Matos D. G, Furnus C. C. 2000. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology* 53(3):761-771.

De Matos , D .G, Furnus, C.C. ; Moses, D.F. and Baldassarre , H. (1995). Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured in vitro.*Mol Reprod and Develop*; 42: 432-436.

De Paz, P.; Sanchez, A.J.; Fernandez, J.G.; Carbajo, M.; Dominguez, J.C.; Chamorro, C.A. and Anel, L. (1994) .Sheep embryo cryopreservation by vitrification and conventional freezing.

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

Theriogenology.;42(2):327-38.

Dedieu , T. Gall , I. ; Crozet , N. ; Sevellec , C. and Ruffini , S. (1996). Mitogen activated Protein Kinase activity during goat oocyte maturation and the aquisition of meiotic competence . *Mol* . *Repord* . Dev. 45 : 351-358.

Defelici , M. and Siracusa, G. (1982) . "Spontaneous" hardening of the zona pellucida of mouse oocyte during in vitro culture . II. The effect of follicular fluid and Glycosaminoglycan . *Game* . *Res*. 12 : 227-235.

DeSmedt , V. ; Crozet , N. ; and Gall, I. (1994) . Morphological and functional changes accompanying the acquisition of meiotic competence in ovarian goat oocytes . *J. Exp. Zool*. 269 : 128-139.

DeSmedt , V. ; Crozed ,N. ; Ahmed -Ali , M. ; Martino , A. and Cogine , Y. (1992) . In vitro maturation and fertilization of goat ocytes . *Theriogenology* . 37 : 1049-1060.

Dinnyes , A.; Keefer, C.L.; Stice, S.L.; Solti, L.; Vajta, G. ; Machaty, Z.and Rall, W.F. (1994).Vitrification of IVMFC bovine embryos in VS3A and EFS solutions: a preliminary report. *Theriogenology*; 41:189.

Dobrinsky, J.R.,(2002). Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology* 57, 285-302.

Dobrinsky, J.R.; Nagashima, H.; Pursel, V.G.; Long, C.R.and Johnson, L.A. (1999): Cryopreservation of swine embryos with reduced lipid content. *Theriogenology*, 51, 164.

Donahue , R.P. (1968) . Maturation of mouse oocyte in vivo . J. *Exp. Zool* . 169 : 237-242 .

Donaldson , L.E. ; Hansel , W. and VanVleck , L.D. (1965) . The luteotrophic properties of lutenizing hormone and the nature of oxytocin induced luteal inhibition in cattle . *J. Dairy* . *Sci*. 48 : 331 (Abstr.).

Donnay, I., Auquier, P., Kaidi, S.; Carolan, C., Lonergan, P.; Mermillod, P. and Massip, A. (1998). Vitrification of in vitro produced bovine Blastocysts: methodological studies and development capacity. *Theriogenology*, 52:93-104.

Downs , S.M. ; Dained , S.A. ; Bornslacger ,E.A. ; Hoppe , P.C. and Eppigs (1989) . Purines modulation of cAMP levels an cAMP Phosphodiesterase . activity . *Game* . *Res* . 23 : 323-334. (Abstr.).

Dragovic R. A, Ritter L. J, Schulz S. J, Amato F, Armstrong D. T, Gilchrist R. B.(2005). Role of Oocyte-secreted growth differentiation factor 9 in the regulation of mouse cumulus expansion. *Endocrinology* 146(6):2798-2806.

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

Drost , M. (2002) . Training Manual for Embryo Transfer In Cattle . College of Veterinary Medicine, University of Florida , U.S.A.

Duby , R.T. ; Damiani ,P. ; Looney, C.R. ; Fissore , R.A. and Robl , J.M. (1996) . Prepuberal calves as oocytes donors : Promises and problem . *Theriogenology* . 45 : 121-130.

Duran , D.H. (1998) . Technical aspect of in vitro embryo production .food and fertilizer technology center. http : //www. agent.1-8.

Dutt , R.H. (1963) . Critical period for early embryo mortality ewes exposed to high ambient temperature . *J. Anim* . *Sic*. 22: 713-719.

Dziuk , P.J. (1965) . Timing of maturation and fertilization of the sheep egg . *Anat* . *Rec*. 153 : 211-222.

Earl , C.R. ; Fry , R.C. ; Maclellan , L.J. ; Kelly , J.M. and Armstrong , D.T. (1998) . In vitro fertilization and developmental potentaial of prepubertal calf oocytes . In : Lauria , A. ; Gondolfi , F. ; Enne , G. ;Gianaroli , L. (eds .) Gametes : Development and Function . Roma , Italy : *Serono Symposia P*. 115-137.

Earl, C.R., Kelly, J., Rowe, J. & Armstrong, D.T. (1997) Glutathione treatment of bovine sperm enhances in vitro blastocyst production rates. *Theriogenology* 47, 255.

Edwards , J.L. and Hansen , P.J. (1997) . Elevated temperature increases heat shock Protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes . *Biol. Repord* . 55 : 340-346.

Eppig , J.J. (2001) . Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals . *Repord* . 122 : 829-838.

Eppig , I.J. and Schroeder , A.C. (1986) . Culture systems for mammalian oocyte development and prostects . *Theriogenology*. , 25 : 97-106.

Eppig , J.J. (1979) . Gonadotropin stimulation of the expansion of cumulus oophorus isolated from mice general conditions for expansion in vitro . *J. Exp. Zool*. 208 : 111-115.

Esaki, R.; Ueda, H.; Kurome, M.; Hirakawa, K.; Tomii, R.; Yoshioka, H.; Ushijima, H.; Kuwayama, M. and Nagashima, H., (2004). Cryopreservation of porcine embryos derived from in vitro-matured oocytes. *Biol. Reprod*. 71, 432-437.

Eyestone, W. H. ; Jones, J. M. and First , N. L. (1991). Some factors affecting the efficacy of oviduct tissue-conditioned medium for the culture of early bovine embryos. *J Reprod Fertil* 92(1):59-64.

Fair, T; Hyttel, P. and Greve, T. (1995). Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol. Reprod. Dev*., 42: 437-442.

First , N.L. and Parrish ,J. (1987) . In vitro fertilization of ruminants . *I. Repord* . *Fertil* . *Suppi*. 34: 151-165.

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

Freter , R. (1986) . Follicular control of mouse oocytes maturation . Diss. Abstr. 46 : 2581.

Fukui , Y. ; Lee , E.S. and Araki , N. (1996) . Effect of medium Renewal during culture in two different culture systems on development to blastocysts from in vitro produced early bovine embryos . *J. Anim. Sci.* 74 : 2752-2758.

Fukui ,Y.; McGowan, L. T.; James, R. W.; Pugh, P. A. and Tervi,t H. R. (1991). Factors affecting the in-vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *J Reprod Fertil* 92(1):125-131.

Fukui ,Y. (1990) . Effict of follicle cells on the acrosome reaction , fertilization and developmental competence of bovine oocytes matured in vitro . *Mol. Repord . Dev*. , 26 : 40-46.

Fukui , Y. ; Fukushima , M. ; Terawaki , Y. and Ono , H. (1982) . Effect of Gonadotropin , steroids and culture media on bovine oocyte maturation in vitro . *Theriogenology* , 18 : 161-174.

Fukui , Y. and Sakuma , Y. (1980) . Maturation of bovine oocyte cultured iv vitro : Relation to ovarian activity , follicular size and the presence or absence of cumulus cells . Biol. Repord . 22 : 669-673.

Fuller , B.J. and Paynter , S.J.(2007). Cryopreservation of mammalian embryos. Methods *Mol. Biol*. 368, 325-329.

Gajda , B. ; Smorąg , Z. and Bryła , M., (2008b). Effect of phenazine ethosulfate on porcine Blastocysts development, apoptosis, and cryotolerance after open pulled straw Vitrification. *Reprod. Fert. Develop.* 20, 118, Abstr. 75.

Gajda , B.; Romek , M.; Krzysztofowicz , E. and Smorąg , Z., (2008a). Evaluation of lipid content in porcine embryos cultured in modified conditions. *Reprod. Domest. Anim*. 43, Suppl. 3, 116-117.

Gajda , B.; Smorąg, Z.; Wierzbowsk,i S.; Jura, J. and Wieczorek , B., (1989). Transfer of vitrified sheep morula. *Zuchthyg*. 24, 97-100

Galli, C. and Moor, R. M. (1991). Gonadotropin requirement for the in vitro maturation of sheep oocytes and their subsequent embryonic development. *Theriogenology*, 35: 1083-1093.

Gardner , D. K.; Pool ,T. B. and Lane, M. (2000). Embryo nutrition and energy metabolism and its relationship to embryo growth, differentiation, and viability. *Semin Reprod Med* 18(2):205-218.

Gasparrini, B.; Boccia , L.; Marchandise , J.; Di Palo, R.;George, F.and Donnay, I. (2006).Enrichment of in vitro maturation medium for buffalo (Bubalus bubalis) oocytes with thiol compounds: Effects of cystine on glutathione synthesis and embryo development. *Theriogenology*. 65: 275–287.

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

Gasparrini, B. ;Sayoud, H.; Neglia, G.; Matos , D. G.; Donnay , I. and Zicarelli, L. (2003). Glutathione synthesis during in vitro maturation of buffalo (Bubalus bubalis) oocytes: effects of cysteamine on embryo development. *Theriogenology* 60(5):943-952.

Geshi, M., Yonai, M., Sakaguchi , M. and Nagai, T .(1999):improvement of in vitro co-culture systems for bovine embryos using a low concentration of carbon dioxide and medium supplemented with B-mercaptoethanol. *Theriogenology*, 51, 551-55.

Gibbons, A.; Cueto, M.I. and Pereyra Bonnet, F.(2010).A simple vitrification technique for sheep and goat embryocryopreservation A simple vitrification technique for sheep and goat embryo Cryopreservation. *Small ruminant research* 95(2010) :61-64

Glass , L.E. (1971) . Transmission of maternal proteins into oocytes . Advances in Bio Sciences 6: 29-58.

Gonzalez-Bulnes A., (2007). Effects of breed on follicular dynamics and oestradiol secretion during the follicular phase in sheep. *Reprod Dom Anim*, 42, 29-33.

Gordon , I. (1994) . Production of cattle embryo in the laboratory . CAB International , walling ford , OXON OX108DE , U.K. 672 pp.

Goto, K. and Iritani, A. (1990). Symposium 11. Oocytes and embryos in vitro. Chairperson: T.A.M. Kruip (Nether lands). *Anim Reprod,* 28: 407-413.

Grazul-Bilska, A .T.; Grazul-Bilska , A.T.; Borowczyk , E.; Arndt, W.;Evoniuk, J.; O'Neil, J.J.; BilskiWeigl, R.M. ; James , D.; Kirsch Kim ,C.; Kraft, K.A.; Vonnahme, D.A.; Redmer, M.; Reynolds ; L.P. and Caton , J.S.(2006) . Effects of overnutrition and undernutrition on in vitro fertilization (IVF) and early embryonic development in sheep. *Reproduction* 134:520-531.

Grupen, C.G.; Nagashima , H. and Nottle, M.B.(1995). Cysteamine enhances in vitro development of porcine oocytes matured and fertilized in vitro. *Biol Reprod*, 53 :173–178.

Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y. (2001) .Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the preimplantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update*; 7:175-189.

Guler A, Poulin N, Mermillod P, Terqui M, Cognie Y.(2000). Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on in vitro maturation of sheep oocytes. *Theriogenology* 54(2):209-218.

Haccard , O. ; Sarcevic , B. ; Lewellyn , A. ; Hartley , R. ; Roy , L. ; Izumi , T. ;Erikson , E. and Maller , J.L. (1993) . Introduction of metaphase arrest in cleaving embryos by MAP Kinase . *Sci.* 28 : 1262-1265. (Abstr.).

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

Hafez , B. and Hafez , E.S. (2000) . Reproduction in Farm Animal . 7th Ed. , Lippincott Wiliams and Wilkins , Awolter Kluwer co. , Philadelphia , U.S.A.

Hagen , D.R. and Graboski , R.A. (1990) . Effect of porcine pituitary growth hormone (pGH)on cytoplasmic maturation of porcine oocytes in vitro . *J. Anim. Sci*. 68 : 446-452.

Han, Y.M.; Kim, S.H. and Park, J.S. (2000). Blastocyst viability and generation of transgenic cattle following freezing of in vitro produced, DNA-injected embryos. *Anim. Reprod. Sci*. 63, 53-63.

Hendriksen, P.J.; Vos PL, Steenweg ,W.N.and Bevers MM,Dieleman, SJ. (2000). Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes.*Theriogenology*, 53:11-20.

Howell, C.Y.; Bestor T.H.; Ding, F.; Latham, K.E.; Mertineit, C.; Trasler J.M.; Chaillet, J.R. (2001). Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell*, **104**, 829–838.

Hue, I.; Dedieu, T.; Huneau, D.; Ruffini, S.; Gall, L. and Crozet, N. (1997). Cyclin B1 expression in meiotically competent and incompetent goat oocytes. *Mol Reprod Dev* 47(2):222-228.

Huneau , D. ; Crozet , N. and Ahmed - Ali , M. (1994) . Estrous sheep serum as a potent agent ovine IVF : Effect on cholesterol efflux from spermatozoa and the acrosome reaction . *Theriogenology* , 42 : 1017-1028.

Hunter , R.H.F. and Wilmnt , I. (1984) . Sperm transport in the cow : Preovulatory redistribution of viable cells within the oviduct . *Repord . Nutr. Dev*. 24 : 597-608.

Hunter , R.H.F. and Nicol , R. (1983) . Transport of spermatozoa in the sheep oviduct : Preovulatory sequestering of cells in the caudal isthmus , *J. Exp. Zool*. 228 : 121-128.

Hussein T. S, Froiland D. A, Amato F, Thompson J. G, Gilchrist R. B. (2005). Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *J Cell Sci* 118(Pt 22):5257-5268.

Ignotz , G. ; Lo , M. ; Perez , C. ; Gwathmey , T. and Suarez , S. (2001). Characterization of a fucose - binding protein from bull sperm and seminal plasma that may be responsible for formation of the oviductal sperm reservoir . *Biol. Repord*. , 64 : 1806-1811.

Isachenko, V., J. L. Alabart, M. Dattena, F. Nawroth, P. Cappai, E. Isachenko, M. J. Cocero, J. Olivera, A. Roche, C. Accardo, A. Krivokharchenko, and J. Folch. (2003). New technology for vitrification and field warming and transfer of small ruminant embryos. *Theriogenology*, 59:1209-1218.

Ishimori ,S.P.; Takahashi, Y. and Kanagawa, H. (1992).Factors affecting

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

survival of mouse blastocysts vitrified by a mixture of ethylene glycol and DMSO. *Theriogenology* . 37:481-487.

Issels, R..D.; Nagele, A.; Eckert, K.G. and Wilmanns, W. (1988) Promotion of cystine uptake and its utilization for glutathione biosynthesis induced by cysteamine and N-acetylcysteine. *Biochemical Pharmacology* 37 881–888.

Iulian, R., Vasile, M. ; Zăhan, M.; Paul, T. ; Hettig, A. ;Ileana, M. ; Rusu, A. and Ghiuru, F.(2010): Influence of in vitro maturation system of swine oocytes on embryo obtaining thru ICSI technique. Roman I. et. al./Scientific Papers: *Animal Science and Biotechnologies* 43 (1):321-325.

Iwamatsu , T. and Yanagimachi , I. (1975) . Maturation in vitro of ovarian oocytes of prepubertal and adult hamsters . *Repord* . *Fertil*. 45 : 83-90.

Izadyar F, Van Tol H. T, Colenbrander B, Bevers M. M. (1997). Stimulatory effect of growth hormone on in vitro maturation of bovine oocytes is exerted through cumulus cells and not mediated by IGF-I. *Mol Reprod Dev* 47(2):175-180.

Izquierdo , D. ; Villamediana , P. and Paramio , M.T. (1999) . Effect of culture media on embryo development from prepubertal goat IVM - IVF oocytes . *Theriogenology* , 52 : 847-861.

Jaroslava, H.; Miloslava, L. and Svatopluk, Č. (2010). Effect of Two-step Vitrification on Developmental Competence of in vitro and in vivo Produced Bovine Embryos. ACTA VET. BRNO 2010, 79: S55–S61.

Kaidi, S.; Van Langendonckt, A.; Massip, A.; Dessy, F. and Donnay, I. (1999). ellular Alteration After Dilution Of Cryoprotective Solutions Used For The Vitrification Of In Vitro Produced Bovine Embryos.*theriogenology*, 52:515-525.

Kajihara ,Y. ; Blakcwood , E.G. ; Myers , M.W. ; Kometani , N. ; Goto , K. and Godke , R.A. (1991) . In vitro maturation and fertilization of follicular oocytes obtained from Calves . *Theriogenology* . 35 : 221-229.

Karami, H. ; Shabankareh , M. and Zandi, M._(2010). Developmental potential of sheep oocytes cultured in different maturation media: effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, and cysteamine. *fertility and sterility journal*, 94:335-340 .

Karami, H. ; Shabankareh , M. and Zandi, M._ (2009). The effects of defined, semi-defined and undefined maturation media on cleavage and subsequent embryo development of sheep oocytes: effects of EGF, IGF-I and cysteamine. *New Biotechnology* · Volume 25S ·

Kastrop, P.M. ; Bever , M.M. ; Dostree , O.H. and Kruip , T.A. (1990).

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

Changes in Protein sythesis and phosphorylation patterns during oocyte maturation in vitro . *J. Repord. Fertil*. , 90 : 305-310.

Keskintepe , L. ; Simplicio , A.A. and Brackett , B.G. (1998) . Caprine blastocyst development after in vitro fertilization with spermatozoa frozen in different extenders . *Theriogenology* , 49 : 1265-1274.

Khatir, H. and Anouassi, A. (2006). The first dromedary (Camelus dromedarius) offspring obtained from in vitro matured, in vitro fertilized and in vitro cultured abattoir-derived oocytes. *Theriogenology* 65(9):1727-1736.

Khatir, H; Abdelhaq, A. and Ahmed, T. (2004). Production of dromedary (Camelus dromedarius) embryos by IVM and IVF and co-culture with oviductal or granulosa cells. *Theriogenology,* in press.

Kim , J.Y. ; Kinoshita , M. ; Ohnishi , M. and Fukui , Y. (2001) . Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen - thawed immature and in vitro bovine oocytes . *Repord* . 122 : 131-138.

Kito, S. and Bavister, B.D.(1997).Male pronuclear formation and early embryonic development of hamster oocytes matured in vitro with gonadotrophins, amino acids and cysteamine. *J Reprod Fertil* . 110: 35–46.

Kobayashi, S.; Nagashima, H.; Ymakawa, H.; Kato, Y. and Ogawa ,S. (1990).The survival of whole and bisected rabbit morulae after cryopreservation by vitrification mrthod.*Theriogenology* . 33:777-788.

Kruip, T.A.M.; Bevers, M.M. and Kemp, B.(2000). Environment of oocyte and embryo determines health of IVP offspring. *Theriogenology*, 53:611-618.

Kruip, T. A. M. & Dieleman, S. J. (1985) Steroid Hormone Concentrations In The Fluid Of Bovine Follicles Relative To Size, Quality And Stage Of The Oestrus Cycle. *Theriogenology*, 24, 395-408.

Kumar , A. ; Yadav , P.S. ; Saini , A. and Jindal , S.K. (1997). Chronological studies of meiotic events during bubaline oocyte maturation in vitro. *Inter. J. Anim. Sci*. 12 : 197-200.

Kuwer ,A.; Lemme, E. and Niemann, H. (1999). Developmental Capacity Of Cumulus Oocytes Complexes Collected From Prepubertal Cattle With And Without Gonadotropin Stimulation Employing Ultrasound-Guided Follicular Aspiration. *Theriogenology*, **51**, 323 (Abs).

Labbe , J.C. ; Picard , A. ; Peaucellier , G. ; Cavadore , J.C. ; Nurse , P. and Doree , M. (1989) . Purification of MPF from Starfish : Identification as the HI histrne Kinase P34cdc2 and a possible mechanism for its periodic activation , *cell* , 57 : 253-263.

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

Larsen , W.J. ; Wert , S.E. and Bruner , G.D. (1987) . Differential modulation of rat follicle cell gap junction population at ovulation . *Dev. Biol*. 122 : 61-71.

Lechniak, D.; Kaczmarek, D.; Stanislawski, D. and Adamowicz, T. (2002). The ploidy of in vitro matured bovine oocytes is related to the diameter. *Theriogenology*, 57:1303-1308.

Ledda, S.; Bogliolo, L.; Calvia, P.; Leoni G. and Naitana, S., (1997). Meiotic progression and developmental competence of oocytes collected from juvenile and adult ewes. *J Reprod Fertil*, 109, 73-8.

Lee, E.S.; Fukui, Y.; Lee, B.C.; Lim, J.M. and Hwang, W.S.(2004). Promoting effect of amino acids added to alchemically defined medium on Blastocysts formation and Blastomers proliferation of bovine embryos cultured invitro. *Anim Reprod Sci*, 84:257-267.

Leibfried , M.L. and First , N.L. (1979) . Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro . *J. Anim. Sci*. 48(1) : 76-86.

Leibo, S.P. (1983a): A one-step in situ dilution method for r f ozen-thawed bovine embryos. *Cryo-Lett*., 4, 387-400.

Leibo, S.P. (1983b): A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen thawed embryos. *Theriogenology*, 54, 427-432.

Lenz , R.W. ; Ball , G.D. ; Leibfried , M.L. ; Ax , R.L. and First , N.L. (1983) . In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature dependent processes . *Biol. Repord* . 29 : 173-179.

Li, R.; Norman, R. J.; Armstrong, D. T. and Gilchrist, R. B. (2000). Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. *Biol Reprod* 63(3):839-845.

Li, R.; Cameron, A.W.N.; Batt, P.A. and Trounson, A.O. (1990). Maximum survival of frozen goat embryos is attained at the expanded, hatching and hatched blastocyst stages of development. *Reprod. Fert*. Develop. 2, 345-350.

Lonergan , P. ; Managhan , P. ; Rizos , D. ; Boland , M.P. and Gordon P. (1994) . Effect of follicular size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation , fertilization and culture in vitro . *Mol. Repord . Dev*. 37 : 48-53.

Lorraine , L.M. and Bavister , B.D. (1982) . Effect of epinephrine and hypotaurine on in - vitro fertilization in the golden hamster . *J. Repord*. 66 : 87-93.

Lu , K.H. ; Shi , D.S. ; Jiang , H.S. ; Goulding , D.; Boland , M.P. and Roche , J.F. (1991) . Comparison of the developmental capacity of

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

bovine oocytes from superovulated and non stimulated heifers . *Theriogenology* , 35 : 234 (Abstr.).

Luiciana, A.P.;Loan, G. and Liviu, B.(2009). Morpho metric Evaluation Of Mature Sheep Oocytescollected By Median Laparatomy . Euro-Mediteranean Research Multi –Confrence- Unity and Diversity of Euro-mediterranean Identities.

Luciano, A.M.; Goudet, G.; Perazzoli, F.; Lahuec, C. and Gérard ,N. (2006) .Glutathione content and glutathione peroxidase expression in in-vivo and in vitro matured equine oocytes. *Mol reprod* . 73:658-666.

Luciano, A. M.; Lodde, V.; Beretta, M. S.; Colleoni, S.; Lauria, A. and Modina, S. (2005). Developmental capability of denuded bovine oocyte in a co-culture system with intact cumulus-oocyte complexes: role of cumulus cells, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and glutathione. *Mol Reprod Dev* 71(3):389-397

Lui , C.W. ; Cornett , L.E. and Meizel , S. (1977) . Identification of the bovine follicular fluid Protein involved in the in vitro induction of the hamster acrosome reaction . *Biol. Repord* . 17 : 24-41.

Lussier ,J.G. ; Matton , P. and Dufour , J.J. (1987) . Growth rates of follicles in the ovary of the cow . *J. Repord* . *Fert*. 81 : 301-307.

Mahmoudzadeh AR, Van Soom A, Bols P, Ysebaert MT, de Kruif A. 1995. Optimization of simple vitrification procedure for bovine embryos produced in vitro: effect of developmental stage, two steps addition of cryoprotectant and sucrose dilution on embryonic survival. *J Reprod Fertil*, 103:33-39.

Majerus V, De Roover R, Etienne D, Kaidi S, Massip A, Dessy F, Donnay I. (1999). Embryo production by ovum pick up in unstimulated calves before and after puberty. *Theriogenology*, 52:1169-1179.

Mariana , J.C. and Machado , J. (1976) . Etude de la formation de la ntrum dans les follicules de lovaire de ratte et de vache normales ou stimulees par PMSG . Anuls. *Biol. Anim. Biochim* . *Biophys*. 16 : 545-559.

Marion , G.B. and Gier , H.T. (1971) . Ovarian and uterine bryogenesis and morphology of the non-pregnant female mammal . *J. Anim. Sci*. 32 : (suppl.1) , 24-47.

Martínez A.G. , Valcárcel A. , C.C. Furnus, D.G. de Matos, G. Iorio, M.A. de las Heras,: (June 2006):Cryopreservation of in vitro-produced ovine embryos. *Journal of science*, Volume 63, Issue 3, Pages 288-296.

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

Martino , A. ; Mogas , T. ; Palomo , M.J. and Paramio , M.T. (1994a). In vitro maturation and fertilization of prepubertal goat oocytes . *Theriogenology* . 41 : 473-485.

Martino A.; Palomo M.J.; Mogas T.; Paramio M.T., (1994b). Influence of the collection technique of prepubertal goat oocytes on in vitro maturation and fertilization. *Theriogenology* 42(5), 859–873

Masui , Y. and Clark , H. (1979) . Regulation of oocyte maturation . Int. Rev. Cytol. , 57 : 185-282.

McEvoy, T.G.; Coull, G.D., Broadbent, P.J.; Hutchinson, S.M. and Speake, B.K. (2000). Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *J. Reprod. Fertil.* 118, 163-170.

Mermillod, P.; Locatelli, Y.; Dalbiès-Tran, R.; Uzbekova, S.; Baril, G.; Guignot, F.; Perreau, C.; Poulin, N.; Touzé J, L.; Pennetier, S.;Schmaltz, B. And Cognié, Y. (2006). In Vitro Production Of Ruminant Embryos: Results, Limits And Perspectives. Symposium COA/INRA Scientific Cooperation In Agriculture, Tainan (Taiwan, R.O.C.), November 7-10.

Mermillod, P. and Marchal, R. (1999). Oocyte of domestic mammals: a model for the study of in vitro maturation. *Contracept Fertil Sex* 27(6):440-448.

Miyano, T. (2003). Bringing up small oocytes to eggs in pigs and cows. *Theriogenology*, 59: 61-72.

Mogas, T.; Palomo, M.J.; Izquierdo, M.D. and Paramio, M.T., (1997 b). Morphological Events During In Vitro Fertilization Of Prepubertal Goat Oocytes Matured In Vitro. *Theriogenology*, **48**, 815-829.

Mogas, T.; Palomo, M.J.; Izquierdo, M.D. and Paramio, M.T. (1997 a): Developmental capacity of in vitro matured and fertilized oocytes from prepubertal and adult goats. *Theriogenology*, 47: 1189-1203.

Mohammadi-Roushandeh1a., Noori-Mooghahi1m. H., Pasbakhsh1p., Abddvahabi A., Akbari1m., Shokrgozar2 A. And Sobhani1a.(2006). Effect Of Cysteamine On The Rate Of In Vitro Maturation Of Oocytes In Two Media. *Acta Medica Iranica*, 44(3): 167-171; 2006 Tehran University Of Medical Sciences

Moore, K.L. (1988) . Essentials of Human Embryology , B.C. ; Decker . Inc. , Hong Kong .

Moor , R.M. And Grosby , I.M. (1985) . Temperature induced abnormalities in sheep oocytes during . *J. Repord. Fert*. 75 : 464-473.

Moor , R.M. ; Polge , C. and Willadsen , S.M. (1980) . Effects of follicular steroids on the maturation and fertilization of mammalian oocytes . *J. Embryol. Exp. Morph*. 56 : 319-335.

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

Moor , R.M. and Trounson , A.O. (1977) . Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocyte in vitro and their subsequent developmental capacity . *J. Repord. Fert*. 49 : 101-109.

Morton, K.M.;Maxwell,W.M.C.;Evans,G.(2003):The Effect Of Fsh Concentration During Ivm And Gamete Co-Incubation Length During Ivf On The Development Of Unstimulated Prepubertal Ewe.Oocytes.,Proc.Soc.*Reprod.Fert*.P18 :Abstract.

Motlagh, M.K., Shahneh, A.Z.; Daliri, M.; Kohram, H. and Gharagozlou, F. (2008) . In vitro maturation of sheep oocytes in different concentrations of mare serum. *African Journal of Biotechnology* Vol. 7 (18), pp. 3380-3382.

Motlik , and Fulka , J. (1986) . Factor affecting meiotic competence in pig oocytes . *Theriogenology* . 25 : 87-96.

Moussa, M. ; Bersinger , I. ; Doligez , P. and Guignot, F. (2005). In vitro comparisons of two Cryopreservation techniques for equine embryos: Slow-cooling and open pulled straw (OPS) vitrification. *Theriogenology*. : 64:1619 -1632.

Murdoch , W.J. and Vankirk , E.A. (2001) . Estrogenic upregulation of DNA polymerase B in oocytes of preovulatory ovine follicles . *Mol. Repord. Dev*. 58 : 417-432.

Nagai , T. (2001) . The improvement of in vitro maturation system for bovine and porcine oocytes . *Theriogenology* , 55(6) : 1291-1301. (Abstr.).

Nagashima H., Kashiwazaki N., Ashman R.J., Grupen C.G., Seamark R.F., Nottle M.B.(1994). Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. *Biol. Reprod*. 51, 618-622

Naitana, S., P. Loi, S. Ledda, P. Cappai, M. Dattena, L. Bogliolo, and G. Leoni. (1996). Effect of biopsy and vetrification on in vitro survival of ovine embryos at different stages of development. *Theriogenology*, 46:813-824.

New Comb , E. ; Christle , W. and Rowson , L.E. (1978) . Birth of calves after in vivo fertilization of oocytes removed from follicles and matured in vitro . *Vet. Rec*. 102 : 461-462.

O`callaghan , D. ; Yaakup , H. ; Hyttel , P. ; Spicer , L. J. and Boland , M.P. (2000) . Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology . follicular fluid composition and systematic hormone concentration in ewes . *J. Repord. Fert*. , 118 : 303-313.

O’Kearney-Flynn M., Wade M., Duffy P., Gath V., Boland M.P., Dobrinsky J.M., (1998). Effect of cryopreservation on IVP cattle embryos development in vitro and in vivo. *Theriogenology* 49, 178 (Abstr.).

O-Brien, J. K; Rhodes, S. L; Maxwell, W. M. C. and Evans, G.

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

(1994).Hormonal requirement for in vitro maturation of sheep oocytes. *Theriogenolog*y, 41: 266.

Otoi , T. ; Yamamoto , K. ; Koyama , N. ; Tachikawa S. and Suzuki , T. (1997) . Bovine oocyte diameter in relation to development competence . *Theriogenology* , 48 : 769-774.

Otio , T. ; Yamamoto , K. ; Koyama , N. and Tachikawa , S. (1996). Development of oocytes derived from the first dominant follicles of beef cows . *Vet. Res*. 139 : 396.

Palasz, A.T.; Beltran Brena, P.; Martinem, M.F.; Perez-Garnelo, S.S.; Ramirez, M.A.; Gutierez-Adan, A. and De La Fuente, J. (2008). Development, molecular composition and freeze tolerance of bovine embryos cultured in TCM-199 supplemented with hyaluronan. *Zygote* 16, 39-47.

Palma, G.A. ; Tortonese, D.J. and Sinowatz, F. (2001). Developmental capacity in vitro of prepubertal oocytes. *Anat. Histol. Embryol*, 30: 295-300.

Papadopoulos, S. ; Hanrahan, J. P.; Donovan , A. ; Duffy, P.; Boland, M. P. and Lonergan, P. (2005). In vitro fertilization as a predictor of fertility from cervical insemination of sheep. *Theriogenology* 63(1):150-159.

Parrish , J.J. ; Susko - Parrish , J. ; Wmer , M.A. and First , N.L. (1988). Capacitation of bovine sperm by heparin . *Biol. Repord*. 38 : 1171-1180.

Parrish , J. J. ; Susko-Parrish , J. L . ; Leibfried-Rutledge ,M. L . ; Critser , E. S. ; Eyestone , W. H . and First , N. L. (1986). Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 25(4):591-600.

Patricia Da Silva ,B.; Gayani , S.; Jayasooriya ; Jocelyn, M.; Mora Margaret , M.; Timothy , A.R.; Marianne ,B.; Jaroslav , S.; Stephen F. and Kate , H.A. **(**2008). Effect Of Cell Shape And Packing Density On Granulosa Cell Proliferation And Formation Of Multiple Layers During Early Follicle Development In The Ovary *Journal Of Cell Science*, 121, 3890-3900**.**

Pavlok , A. ; Lucas - Hahn , A. and Niemann , H. (1992) . Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles . *Mol. Repord. Dev*. 31 : 63-67. (Abstr.).

Pawshe, C.H.; Palanisamy, A.; Taneja, M.; Jain, S.K.and Totey, S.M. (1996): Comparison of various maturation treatments on in vitro maturation of goat oocytes and their early embryonic development and cell numbers.*Theriogenology*, 46: 971-982.

Perrault, S.D., Barbee, R.R. & Slott, V.L. (1988). Importance of

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev. Biol*. 125, 181–6.

Pinyopummintr , T. and Bavister , B.D. (1991) . In vitro -matured / in vitro - fertilized bovine oocytes can develop into morula / blastocysts in chemically defined , Protein - free culture media . *Biol. Repord*. 45 : 736-742.

Polge, C., A.U. Smith and A.S. Parkes. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164:666

Presicce , G.A. ; Jiang, S. ; Simkin, M. ; Zhang , L. ; Looney , C.R., Godke, R.A. and Yang, X. (1997). Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepurbertal calves. *Biol Reprod*, 56:386-392.

Ptak , G. ; Dattena , M. ; Loi , P. ; Tischner , M. and Cappai , P.(1999a). Ovum pick-up in sheep: Efficiency of in vitro embryo production, vitrification and birth of offspring. *Theriogenology* 52, 1105-1114

Ptak , G. ; Loi , P. ; Dattena , M. ; Tischner , M. and Cappai , P. (1999b). Offspring from one - month - old Lambs : Studies on the developmental capability of repubertal oocytes . *Biol. Reprod*. 61 : 1568-1574.

Pugh , P.A. ; Ankersmit , A.E. ; McGowan L.T., Tervit H.R., 1998. Cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos: effects of protein type and concentration during freezing or of liposomes during culture on post-thaw survival. *Theriogenology* 50, 495-506.

Rao, B.S.,Naidu, K.S., Amarnath, D.,Vagdev, R., Rao, A.S.,Brahmaiah K.V., Rao, V.H. (2002).in vitro maturation of sheep oocytes in different media during breeding and non-breading seasons ,*small ruminant research* 43:31-36 .

Rezk ,W.K. (2005). Differences Between Farm Animals In (IVM and IVF) *In Vitro* Maturation And *In Vitro* Fertilization. Master thesis. Mansoura University -Faculty of Agriculture Animal Production Department-Egypt.

Rivera , R.M. and Hansen , P.J. (2001) . Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperature in the physiological range . *J. Repord. Fert*. 121 : 107-115.

Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Perez-Garnelo, S., De La Fuente, J., Boland, M. P. and Lonergan P.(2003). Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod 68(1):236-243.*

Rocha , A. ; Randel , R.D. ; Broussard , J. R. ; Lim , J.M. ; Blair , R.M. ;

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

Roussel , J.D. ; Godke , R.A. and Hansel, W. (1998) . High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in Bos taurus but not in Bos indicus cow . *Theriogenology* , 49 : 657-665.

Rodrigues - Gonzalez ; E. Lopez - Bejar, M., Mertens, M.J. and Paramio, M.T. (2003). Effects on in vitro embryo development and intracellular glutathione content of the presence of thiol compounds during maturation of prepubertal goat oocytes. *Mol. Reprod. Dev*. 65, 446–53.

Rodriguez-Gonzalez, E. ; Lopez-Bejar , M. ; Velilla , E. ; Mertens , M.J. and Paramio , M.T. (2001).Male pronuclear formation in prepubertal goat oocytes after in vitro maturation in the presence of thiol compounds. *Theriogenology* . 55: 493.

Romero-Arredondo, A. and Seidel, GE Jr. (1996). Effects of follicularfluid during in vitro maturation of bovine oocytes on in vitro fertilization and early embryonic development. *Biol. Reprod*., 55:1012-1016.

Romero - Arredondo , A. and Seidel , G.E. (1994) . Effects of bovine follicular fluid on maturation of bovine oocytes . *Theriogenology* , 41 : 383-394.

Ruffing , N.A. ; Steponkus , P.L. ; Pitt , R.E. and Parks , J.E. (1993). Osmometric behaviour, hydraulic conductivity, and incidence of intracellular ice formation in bovine oocytes at different developmental stages. *Cryobiology* 30, 562-580.

Rutledge , J.J. ; Monson , R.L. ; Northey , D.L. and Leibfrid - Rutledge , M.L. (1999) . Seasonality of Cattle embryo production in temperate region . *Theriogenology* , 50 : 330 (Abstr.).

Saeki, K; Hoshi, M; Leibfried-Rutledge, M.L. and First, N. L. (1990). Invitro fertilization and development of bovine oocytes matured with commercial available follicle stimulating hormone. *Theriogenology*, 34: 1035-1039.

Saha, S., T. Suzuki. (1997). Vitrification of in vitro produced bovine embryos at different ages using one- and three-step addition of cryoprotective additives.*Reprod. Fertil*. Dev. 7, 741-746.

Samake , S. ; Amoah , E.A. ; Mobini , S. ; Gazal , O. and Gelaye , S. (2000) . In vitro fertilization of goat oocytes during the non - breeding season . *Small Ruminant Res*. 35 : 49-54.

Sanbuissho, A. and Threlfall, W. R. (1990). The effect of serum and gonadotropins on in vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, 34: 341-348.

SAS., (1996). SAS/Stat. User's Guide Static's, Ver., 6.06 4th Ed. SAS Institute Inc. Cary, NC.

Sato, E.; Matsuo, M. and Miyamoto, H. (1990). Meiotic maturation of

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

bovine oocytes in vitro: imporvment of meiotic competence by dibutyryl cyclic adenosine 3`,5`-monophosphate. *J. Anim. Sci*., 68 : 1182-1187.

Sato , E. ; Iritani , A. and Nishikawa , Y. (1977) . Factors involved in maturation of pig and cattle follicular oocytes culture in vitro . *J. Anim. Reprod* . 23 : 12-18.

Schoevers, E.J., Kidson, A., Verheijden, J.H.M., Bevers, M.M.,.(2003) Effect of follicle-stimulating hormone on nuclear and cytoplasmic maturation of sow oocytes in vitro, *Theriogenology*, 59, 2017-2028

Schultz , R.M. (1986) . Molecular aspects of mammalian oocytes growth and maturation . In : Rossant , J. , Pedersen , R.A. , eds. Experimental approaches to mammalian embryonic development . Cambridge : Cambridge University Press . 195-238.

Schwier, M.C., Rall, W.F., Stuart, L.D. and Wildt, D.E. (1990): In situ straw dilution of ovine embryos cryopreserved by conventional freezing or vitrification. *Theriogenology*, 33, 321 (Abstr.),

Seidel Jr, G.E. (2006). Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology* 65, 228-235

Sharma, G.T. ; Majumadar , A.C. and Bonde , S.W. (1996) . Chronology of maturational events in goat oocytes cultured in vitro . *Small Ruminant Res*. 22(1) : 25-30. (Abstr.).

Shi , D.S. ; Avery , B. and Greve , T. (1998) . Effects of temperature gradients on in vitro maturation of bovine oocytes .Theriogenology . 50 : 667-674.

Shirazi A, Soleimani M, Karimi M, Nazari H, Ahmadi E, Heidari B. Vitrification of in vitro produced ovine embryos at various developmental stages using two methods. *Cryobiology* 2010;60(2):204-210

Shojro, K., M. Miyuki, U.Shuji. (2006). survivability of vitrified bovine embryos produced in vitro using Nylon Thread (2) Development method of Vitrification solution diluted in a straw. *Science Links* Japan. 25: 99-103. (abstract)

Sirard ,M. A. ; Richard ,F . ; Blondin , P. and Robert , C. (2006). Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 65(1):126-136.

Sirard , M. A. (2001). Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology* 55(6):1241-1254.

Sirard, M. A; Richard, F. and Mayes, M. (1998). Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: A review. *Theriogenology*, 49: 483-497.

Sirard , M. and Lambert , R. (1986) . Birth of Caves after in vitro fertilization using Laparoscopy and rabbit oviduct incubation of zygotes . *Vet. Rec.* , 119 : 167-169.

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

Smith , A.U. (1953): In vitro experiments with rabbit eggs .Mammalian *Ger Fuond Symp*.,pp 217-222,London.

Smith , A.U. (1952):Behavior of fertilized rabbit eggs exposed to glycerol and to low temprature.*Nature*, 170,374-375.

Sokoloski , J.E. and Walf , D.P. (1989) . Laboratory conditions for human in vitro fertilization in : Human fertilization in vitro , edited by Walf , D.P. and Quigley , M.M. , New York , *Plenum Press pp* : 128.

Sogorescu, E. ; Zamfirescu, S. and Anghel, A.H.(2010). The influence of new media on the developmental Competence of goat and sheep oocytes. *Romanian Biotechnological Letters, Vol. 15, No.3,* 2010, Supplement.

Spicer , L. J. ; Klindt , J. ; Buonomo , F.C. ; Maurer , R. ; Yen , J.T. and Echternkamp , S.E. (1992) . Effect of porcine somatotropin on number of granulosa cell luteinizing hormone / human Chorionic gonadotropin receptors ,oocyte viability , and concentration of steroid and insulin - like growth factors I and II in follicular fluid of lean and obese gilts . *J. Anim. Sci*. 70 : 3149-3157.

Stubbs , S.A . ;Stark , J. ; Dilworth , S.M. ; Franks , S. and Hardy, K.(2007). Abnormal preantral folliculogenesis in polycystic ovaries is associated with increased granulosa cell division. J Clin *Endocrinol Metab* .92:4418-4426.

Sun , Q.Y. ; Blumenfeld , Z. ; Rubinstein , S. ; Goldman , S. ; Gonen , Y. and Breitbart , H. (1999) . Mitogen - activated Protein Kinase in human eggs . *Zygote* , 7 : 181-185.

Sutton-McDowall M. L, Gilchrist R. B, Thompson J. G. (2004). Cumulus expansion and glucose utilization by bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation: the influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone. *Reproduction* 128(3):313-319.

Suzuki , C. and Yoshioka , K. (2006). Effects of amino acid supplements and replacement of polyvinyl alcohol with bovine serum albumin in porcine zygote medium. *Reprod. Fert*. Develop. 18, 789-795

Suzuki, H., X. Yang and R.H. Foote. (1994). Surface characteristics and size changes of immature, in vitro matured and in vitro fertilized bovine oocytes. *Theriogenology* 41:307 (Abstr.).

Suzuki, T., Yamamoto, M., Ooe, M., Sakata, A., Matsuoka,M., ishikata, Y. and Okamoto, K. (1990): Effect of sucrose concentrations used for one-step dilution upon in vivo survival of bovine embryos refrigerated in glycerol. *Theriogenology*. 34: 1051-1057.

Szollosi, D.; Desmedt, V.; Crozet, N. and Brender, C.(1988): In vitro maturation of sheep ovarian oocytes. *Reprod. Nutr*. Dev., 28: 1047-1080.

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

Szybek , K. (1972) . In vitro maturation of oocytes from sexually immature mice . *J. Endocr*. 54 : 527-528.

Tachikawa, S., T. Otoi, S. Kondo, T. Machida, and M. Kasai. (1993). Successful vitrification of bovine blastocysts, derived by in vitro maturation and fertilization. *Mol. Reprod. Dev*. 34:266-271.

Takahashi , M . ; Nagai, T. ; Okamura, N. ; Takahashi, H. and Okano , A. (2002). Promoting effect of beta-mercaptoethanol on in vitro development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. *Biol Reprod* 66(3):562-567.

Takahashi, M., Nagi, T., Hamos, S., Kuwayaama, M., Okamura, N. and Okano, A.(1995):effect ofco- culture cells on the uptake of cystine into bovine embryos .*Theriogenology*, 43, 332(abstr.).

Tan , J. (2004) . Vitrification of human oocytes and bovine oocytes and embryos . presented to the ISEF judging Commite. Canada.

Tan , S.J. and Lu , K.h. (1990) **.** Effect of different Osetrous stages of ovaries and sizes of follicles on generation of bovine embryos in vitro . *Theriogenology* . 33 : 335 (Abstr.).

Taneja , M.; Bols , P.E.; Van De Velde , A.; Ju J.C; Schreiber , D.; Tripp , M.W.; Levine , H.; Echelard , Y.; Riesen , J. and Yang X., (2000). Developmental competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. *Biol Reprod*, 62, 206–213.

Taneja, M., Kelly, J., Rowe, J. & Earl, C.R. (1998). Influence of glutathione in the presence of heparin and caffeine on bovine in vitro fertilisation. *Theriogenology* 49, 298.

Tatemoto , H. and Horiuchi , T. (1995) . Requirement for Protein synthesis during the onset of meiosis in bovine oocytes and its involvement in the autocatalytic amplification of maturation - promoting factor . *Mol. Repord*. Dev. 41 : 47-53 (Abstr.).

Thibault , C. (1977) . Hammond memorial lecture . Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes . *J. Repord. Fert*. 51 : 1-15.

Totey , S.M. ; Pawshe , C.H. and Singh , G.P. (1993) . In vitro maturation and fertilization of buffalo oocytes (bubalus bubalis) : effect of media , hormone , and sera . *Theriogenology* , 39 : 1153-1171.

Totey, S.M., Singh, G., Taneja, M, Pawshe, C.H. and Talwar, G.P. (1992). In vitro maturation, fertilization and development of follicular oocytes from buffalo (Bubalus bubalus). *J.Reprod. Fertil*., 95: 595-607.

Tradi A.S., Leboeuf B., Cognie Y., Poulin N., Mermillod P.(1999). Comparative results of in vitro and in vivo survival of vitrified in vitro produced goat and sheep embryos. *Theriogenology* 51, 257

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

(Abstr.)

Trounson , A. ; Anderiesz , C. and Jones , G. (2001) . Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence . *Repord*. 121 : 51-75.

Trounson , A. and Caro , A. (1984) . Research in human in vitro fertilization and embryo transfer . *Br. Med. J*. 285 : 244.

Tsafriri , A. ; Dekel, N. and Bar - Ami , S. (1982) . The role of oocyte maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte maturation . *J. Repord. Fert*. 64 : 541-551.

Tsunoda, Y. and Sugie, T. (1977). Survival of rabbit eggs preserved in plastic straws in liquid nitrogen. *J. eprod.Fert*., 49, 173-174.

Vajta, G., and M. Kuwayama. (2006). Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, 65:236-244.

Vajta , G. ; Lewis , L.M. ; Hyttel , P. ; Thomas , G.A. and Trounson , A.O. (2001) . Somatic cell cloning without micro manipulators . cloning , 3 (2) : 89-95.

Vajta , G. ; Holm , P. ; Greve , T. and Callesen , H. (1997) . Vitrification of porcine embryos using the open pulled straw (OPS) method . Acta. *Vet. Scand*. , 38 : 349-352.

Vajta , G. ; Holm , P.; Greve ,T. and Callesen , H. (1996). Overall efficiency of in vitro embryo production and vitrification in cattle. *Theriogenology* 45, 683-689.

Verbessem , D. ; Camu , F. ; Devroey , P. and Steirteghem ,A. (1988). Pneumo peritoneum induced PH changes in follicular and Donglas fluids during laproscopic oocyte retrieval in human Hum. *Repord*. 6 : 751-754.

Vigneron , C. ; Perreau , C . ; Dalbies-Tran , R . ; Joly , C.; Humblot , P. ; Uzbekova , S. and Mermillod , P. (2004a). Protein synthesis and mRNA storage in cattle oocytes maintained under meiotic block by roscovitine inhibition of MPF activity. *Mol Reprod Dev* 69(4):457-465.

Vigneron , C. ; Perreau , C. ; Dupont , J. ; Uzbekova, S. ; Prigent, C. and Mermillod , P. (2004b). Several signaling pathways are involved in the control of cattle oocyte maturation. *Mol Reprod* Dev 69(4):466-474.

Voelkel S. A, Hu Y. X. (1992). Effect of gas atmosphere on the development of one-cell bovine embryos in two culture systems. *Theriogenology* 37(5):1117-1131.

Wahid, H; Monaghan, P. and Gordon, I. (1992). In vitro maturation (IVM) of sheep follicular oocytes. *J. Reprod. Fertil*., 9: 52-63.

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

Wahid, H.; Gordon, I.; Sharif, H.; Lonergan, P.; Monaghan, P. and Gallagher, M. (1991): Development of ovine blastocysts following maturation, fertilization and culture of oocytes in vitro. Proceedings of the Seventh Meeting of the European Embryo .

Wani N. A; Wani G.M.; Khan M.Z.; Salahudin S. (2000). Effect of oocyte harvesting technique on in vitro maturation and in vitrofertilization in sheep. Small Rum. Res., 36, 63-67 .

Warnes , G.M. ; Moor , R.M. and Johnson , M.H. (1977) . Changes in protein synthesis during maturation of sheep oocyte . in vivo and in vitro . *J. Repord. Fert*. 49 : 331-335.

Wassarman , P.M. (1996) . Oogenesis . In : Reproduction Endocrinology , Surgery and Technology . Ed. By :Adashi , E.Y. ; Rock , J.A. and Rosenwaks , Z. , *Lippincott - Raven publishers Philadelphia* . PP. 342-357.

Wassarman , P.M. (1993) . Mammalian eggs , sperm and fertilization : Dissimilar cells with acommon goal . *Dev. Biol*. 4 : 189-197.

Whittingham, D.G., S.P. Leibo and P. Mazur. (1972). Survival of mouse embryos frozen to 196°C and -269°C. *Science* 178:411-414.

Willadsen, S.M., C. Polge, L.E. Rowson and R.M. Moor. (1976). Deep freezing of sheep embryos. *J. Reprod. Fertil*. 46:151-154.

Willadsen, S.M., Polge, C., Rowson, L.E.A. and Moor, R.M. (1974): Preservation of sheep embryos in liquid nitrogen. *Cryobiology*, 11, 560 (Abstr.).

Wilmut I., Rowson L.E.A., (1973). Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet. Res*. 92, 686-690.

Wilmut, I.(1972) :The effect of cooling rate , warming rate,cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing . *Life Sci.*,11, 1071-1079.

Wise , T. (1987) . Biochemical analysis of bovine follicular fluid : Albumin , total protein , Lysosomal , enzymes , ions , steroids and ascorpic acid content in relation to follcular size , rank , atresia classification and day of estrous cycle . *J. Anim. Sci*. , 64 : 1153-1169.

Wolfenson , D. ; Thatcher , W.W. ; Badinga , L. ; Savio , J.D. ; Meidan , R. ; Lew , B.J. ; Braw - Tal . R. and Berman , A. (1995) . Effect of heat stress of follicular development during the estrous cycle in lactation dairy Cattle . *Biol. Repord*. 52 : 1106-1113.

Wright , R.W. ; Anderson , G.B. and Cupps , P.T. (1976) . Blastocyst expansion and hatching of bovine ova cultured in vitro . *J. Anim. Sci*. 43 : 170-174.

Xu , K.P. ; Greve , T. ; Smith, S. and Hyttel , P. (1986) . Chronology changes of bovine follicular oocyte maturation in vitro . *Acta. Vet.*

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

Scand. , 27 : 505-519.

Yadav , P.S. ; Saini , A. ; Kumar , A. and Jain , G.G. (1998) . Effect of oviductal cell co- culture on clevage and development of goat IVF embryos . *Anim. Repord. Sci*. 51 : 301-306.

Yadav , P. S. ; Saini , A. ; Solanki , V.S. ; Hooda , O.K. and Jindal , S.K. (1997) . Comparison of follicular fluid and estrus serum on in vitro maturation , fertilization and development of buffalo embryos . *Inter. J. Anim. Sci*. , 12 : 193-196.

Yamauchi N, Nagai T. Male pronuclear formation in denuded porcine oocytes after in vitro maturation in the presence of cysteamine. *Biol Reprod* (1999), 61: 828–833.

Yang , X. ; Kubota , C. ; Szuki , H . ; Bols , P.JE. and Presicce , G .A.(1998). Control of oocyte maturation in cows – Biological factors. *Theriogenology*, 49:471-482.

Yang, X; Jiang, S. and Foote, R.H. (1993). Bovine oocyte developmentfollowing different oocyte maturation and sperm capacitation Procedures. Molecular Reproduction and Development, 34: 94-100.

Yones M., (2008). A Comparison of ovarian function in juvenile and adult ewes using in vitro culture and proteomics. thesis submitted to the the university theof Wales Psh-D. institute of biology,environmental and rural science Aberystwyth university Llanbadran Campus Aberystwyth Geredigion SY23 3AL.

Yoshida, M., Ishigaki, K., Nagai, T., Chikyu, M., (1993). Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability to form male pronucleus. *Biol. Reprod*. 49, 89–94.

Yoshimura , Y. ; Nakamura , Y. ; Koyama , N. ; Iwashita , M. ; Adachi , T. and Takeda , Y. (1993) . Effects of growth hormone on follicle growth oocyte maturation , and ovarian steriodogenesis . *Fertil. Steril*. 59 : 917-923.

Yousaf, M.R. and Chohan, K.R. (2003). Nuclear morphology, diameter and meiotic competence of buffalo oocytes relative to follicle size. *Reproduction*, Fertility and Development, 15: 223-229.

Zheng, S. ; Newton , G.L. ; Gonick, G. ; Fahey, R.C. and Ward , J .F. (1988).Radioprotection of DNA by thiols: relationship between the net charge on a thiol and its ability to protect DNA.*Radiat*. 114: 11-27.

الفصل السابع

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

الملاحق
Appendixes

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

ملحق (1) محلول جمع المبايض المستخدم لحفظ المبايض في المسلخ

المواد	الكمية
NaCl	%0.9
G-Penicillin	75 مغ /ل
Streptomycin Sulphate	75مغ /ل

- يتم تحضيره قبل 24 ساعة من الاستعمال ويحفظ بدرجة 4ْ م

ملحق (2) الاضافات الى الوسط الزرعي TCM1-99 المخصصة لدراسة تاثير عمر الحيوان وفصل السنة وقطر الحويصلة المبيضية وقطر البويضة

المواد	الإنضاج(7.3) pH	الانقسام(7.3) pH
مصل العجل	10 %	–
السائل الحويصلي البقري	5 %	–
FCS	5 %	–
Na-pyruvate	0.11 مغ/مل	0.11 مغ/مل
hCG	25 مايكروغرام/مل	–
BSA	6.0 مغ/مل	3.0 مغ/مل

- يحفظ بدرجة 4ْ م ويستعمل خلال اسبوع واحد من تاريخ تحضيره .

ملحق (3) الاضافات الى الوسط الزرعي TCM-199 المخصص لدراسة تاثير هرمون FSH والسيستامين في الانضاج المخبري لبويضات النعاج (PH=7.3)

الاضافة	الكمية
مصل العجل	7 %
FCS	%1
Na-pyruvate	0.11 مغ/مل
hCG	1 مايكروغرام/مل
BSA	6.0 مغ/مل

* يحفظ بدرجة 4ْ م .

ملحق (4) مكونات الوسط الزرعي TALP الخاص بغسيل، وانضاج واخصاب النطاف مع بعض الاضافات

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

المواد	الوحدات	الغسيل pH (7.3)	الانضاج pH (7.3)	الاخصاب pH (7.7)
NaCl	ميلي مول	114.0	114.0	114.0
KCl	ميلي مول	3.2	3.2	3.2
$NaHCO_3$	ميلي مول	25.0	25.0	25.0
$NaH_2PO_4 2H_2O$	ميلي مول	0.4	0.4	0.4
Na-Lactate	ميلي مول	10.0	10.0	10.0
$CaCl_2$	ميلي مول	2.0	–	2.0
$MgCl_2 6H_2O$	ميلي مول	0.5	0.5	0.5
Phenol red	مايكروغرام/مل	10.0	10.0	10.0
HEPEs	ميلي مول	10.0	5.0	0.5
Na-Pyruvate	مغ/مل	0.11	1.0	0.5
Glucose	ميلي مول	5.0	12.5	5.0
BSA	مغ/مل	6.0	6.0	6.0
FCS	%	10	–	–
مصل العجل	%	10	–	–
hCG	مايكروغرام/مل	1	–	–
FSH	مايكروغرام/مل	0.1	–	–

*يحفظ بدرجة 4ْ م

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

ABSTRACT

This study was carried out at the Agriculture biotechnology research laboratory of animal production department during 15/3/2008 - 30/10/2010 , to investigate IVM, IVF and development of Awassi ewes oocytes , and to study the effects of ewes age, season of the year, interaction between ewes age and season, follicle size, oocytes diameter, FSH levels, Cysteamine levels, chronological events of meiotic division , and to determine the best cryoprotectants for embryos survivability by Vitrification technique.

Awassi sheep ovaries were collected weekly from ewes between 8 months to 4 years of age, The ovaries were collected within approximately 10-15 minutes post slaughtering, washed once with warm water , all ovaries were placed immediately into thermos in saline solution (0.9% NaCl) supplemented with antibiotics at 37°C. Thereafter, all collected ovaries were transported to the laboratory within 1 h. Each ovary was held by a forceps and a scalpel blade made incisions through along the whole ovarian surface. Ovaries were washed three times with warm harvesting medium(PBS). Petri dishes were kept undisturbed for short time, allowing the oocytes to settle down.

In the first and second experiments a total of 1363 oocytes were divided according to ewes age into three main groups: A(<1 year), B(1-2) year and C(>2 year) across seasons of the year (winter, spring, summer and autumn), **in the third and fourth experiments** a total of 418 oocytes were obtained from non-atretic follicles dissected from ovaries and allocated into four main groups according to follicle size: A (1 < mm), B(1 –< 2 mm), C(2 –<3 mm) and D (≥3 mm), oocytes allocated according to oocytes diameter into four main groups: A(< 100 µm),B(100-<110 µm), C(110-<120µm) and D (≥120 µm), **In the fifth experiment** a five levels of FSH (A (0) :control, B (0.1 µg/ml), C(1 µg/ml), D (5 µg/ml), E (50 µg/ml) and F (75 µg/ml)) were supplemented to TCM-199 medium for IVM of 1332 oocytes, **in the sixth experiment** a three levels of Cysteamine (A (0) :control, B (100 µM), C (200 µM) and D (400 µM)) were supplemented to TCM-199 medium for IVM of 942 oocytes**, in the seventh experiment** a total of 212 oocytes divided into eight main groups to examine stages of nuclear maturation for 0, 3, 6, 9, 12, 21, 24 and 27 h of IVM in TCM-100 medium .

Oocytes were placed in a four-well culture plate containing TCM-199, covered with sterilized mineral oil. The culture dishes were placed in a CO2 incubator (95% relative humidity, 5% CO2 at 38.5ºC) for 27 h, after the matured oocytes had been denuded, they were co-cultured with capacitated spermatozoa (reaching a final concentration of approximately 1.5 x 10^6 spermatozoa/ml) in TALP medium. From10-15 oocytes placed for 1 ml of fertilization medium and were incubated for 18 h Thereafter, oocytes were washed in PBS to get rid of clinging sperms, checked for second polar body and pronucleus (zygote) under microscope and transferred to in vitro culture droplets for further development inside CO2 incubator and checked for cleavage every 24 h for up to 9 days**. In the eighth experiment** a total of 105 embryos in different stages of cleavage placed in three mediums containing: A

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

(DMSO), B (EG), C (DMSO+EG), every 6 embryos placed in each traditional straws (0.25 ml) and plunged immediately in liquid Nitrogen after subjection for 8 minutes in ES medium and for 1 minute in VS, after keeping for 72 h in liquid Nitrogen embryos thawed gradually in two mediums A(1 M sucrose +20 calf serum+TCM-199), B(0.5 M sucrose + 20 calf serum+ TCM-199) for three minutes , rinsed in TCM-199 , transferred to in vitro culture droplets (TCM-199 medium) and reincubated for further development to determine survivability. Chi-square test was used to compare different rates among different groups at $p<0.01$ and $p<0.05$ significance levels. Fisher Exact test was used for post hoc comparisons by using SAS,9 program .

Differences of ewes age in IVM were statistically significant ($p<0.01$) but insignificant in the IVF and cleavage, where group B (1-<2 years) had the highest value (62.67%). Seasons of the year significantly ($p<0.01$) improved IVM (57.98% in autumn) and IVF (37.91% in summer), differences were statistically insignificant in oocytes during cleavage while oocytes failed to reach cleavage phase in winter. Interaction between ewe age and seasons significantly improved ($p<0.01$) IVM, the highest value was occurred in autumn at group B while the lowest value was in summer at group A (72.04 % and 29.12%), interaction also significantly improved ($p<0.01$) IVF , the highest value was observed in summer at group B while the lowest value was in winter at group A (46.47 % vs. 13.33%) , but insignificant differences were noticed at cleavage phase.

On the study of follicle size and Oocyte diameter, results showed that follicle size significantly($p<0.01$) improved IVM and IVF, the highest percentages of oocytes reached M-II and fertilization phases was in group D (70.83% and 61.76%), there were insignificant differences in cleavage rates among groups, Oocytes from follicles with diameter < 2mm couldn't reach fertilization and cleavage phases . IVM rates differ ($p<0.01$)according to Oocytes diameter, the highest values were in Oocytes with diameter ≥ 110 µm (72.30% and 82.02 % (groups C and D)) Oocytes with diameter < 110 µm failed to reach fertilization and cleavage phases , insignificant differences were observed in IVF and cleavage rates at Oocytes with diameter 110-<120 µm and ≥ 120 µm.

Results showed that adding FSH to maturation medium had variant effects in IVEP. Supplementation with ≥ 50 µg/ml FSH lead ($p<0.01$) to high IVM rates (83.56% and 83.66% (groups E and F)), high levels of FSH reduced ($P<0.01$) embryos rates of blocked (2-16)cell stage comparing with lowest rates in groups E and F, another significant differences ($P<0.05$) were observed at the rates of morula phases (groups E and F) while FSH levels had insignificant differences at embryos in Blastocyst stage despite of superiority of groups E and F.

Supplementation of TCM-199 with Cysteamine increased significantly ($P<0.05$) IVM, the highest value was observed in group B (80.57%) , insignificant differences noticed at IVF and cleavage phases rates among groups , Supplementation of IVM medium with 100µM Cysteamine

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

significantly (P <0.05) improved the morula(39.29%) and Blastocysts (42.86%)stages rates.

On the study of chronological events of meiotic division, The results showed that the germinal vesicle phase (GV) reached 88.46% at time 0 and became 9.67% after 12 h of maturation, 53.84% of oocytes reached germinal vesicle break down phase (GVBD) after 6 hours of Culturing. The oocytes release in state M-I stage after 9 hours (16.66%), M-II phase and the peak of the first polar body appears reaches 71.42% after 27 hours under laboratory conditions.

Vitrification of oocytes by using a mixture of DMSO and EG 1:1 (medium C) significantly (p<0.01) improved survival rates for embryos at (2-16)cell stage(50%), morula stage (90%) and Blastocysts stage (92.85%).

It was concluded that the highest IVM,IVF and division rates were observed from Oocytes derived from ewes in summer and fall and from follicles with size >3 mm and Oocyte diameter with >120 µm. Enrich TCM-199 medium with >50 µg/ml FSH and 100 µM Cysteamine helped in IVEP. Metaphase II stage was found on oocytes after 27 hours of incubating. Using DMSO and EG in 1:1 was more helpful in surviving embryos by Vitrification technique .

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

Key words : Awassi sheep, Oocytes diameter, Age of donor, Season, Follicle size, FSH, Cysteamine, In vitro maturation (IVM), In vitro fertilization (IVF), In vitro culture (IVC), Chronological events, Meiotic division, Morula, Blastocysts, Vitrification, DMSO, EG, Survival rate.

University of Aleppo
Faculty of Agriculture
Department of Animal production

The In Vitro Development, Maturation and Fertilization of Oocytes in Awassi Ewes

Ph.D. Thesis Submitted for the Degree of Doctorate of Science in Agriculture Engineering,
(Department of Animal Production)

Prepared by

Eng. Omar Mardenli

Supervised by

Prof.Dr.Mhi Al-Mizied
Faculty of Agriculture
University of Aleppo

&

Prof.Dr.Soleiman Salhab
Faculty of Agriculture
University of Damascus

1432هـ/2011م

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit

University of Aleppo
Faculty of Agriculture
Department of Animal production

The In Vitro Development, Maturation and Fertilization of Oocytes in Awassi Ewes

Ph.D. Thesis Submitted for the Degree of Doctorate of Science in Agriculture Engineering, (Department of Animal Production)

Prepared by

Eng. Omar Mardenli

1432هـ/2011م

All Rights Reserved - Library of University of Jordan - Center of Thesis Deposit